

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Linda Berková

Příprava a aplikace indukovaných pluripotentních kmenových buněk v hematologii

Generation and application of induced pluripotent stem cells in hematology

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce:

Ing. Lucie Láníková, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 3. 5. 2016

Podpis

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat své vedoucí bakalářské práce Ing. Lucii Láníkové, Ph.D. za pomoc, vstřícný přístup a cenné rady.

ABSTRAKT

Jedním z klíčových objevů buněčné biologie minulého desetiletí jsou indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSCs, induced pluripotent stem cells). Jedná se o pluripotentní buňky, které vznikly reprogramováním diferencovaných somatických buněk za využití pouhých čtyř exogenních transkripčních faktorů. iPSC, které lze získat i ze somatických buněk nesoucích genetickou mutaci, mohou být po následné diferenciaci na potřebný buněčný typ použity při testování nových léčiv a objevování dnes neznámých příčin geneticky podmíněných chorob. iPSC připravené ze zdravých buněk lze pak použít v regenerativní medicíně. Původně byly pro dopravení reprogramujících transkripčních faktorů do buněk využity retrovirové vektory, které ale nejsou pro medicínské použití vhodné, jelikož se integrují do genomu. To bylo důvodem pro vývoj bezpečnějších metod dopravy těchto transkripčních faktorů do buněk.

Ve své práci uvádím metodický přehled způsobů dopravení transkripčních faktorů do buněk, které byly použity pro reprogramování včetně nejčastěji používaných metod testování pluripotence.

Dále popisují možnosti využití iPSC v terapii vybraných geneticky podmíněných hematologických onemocnění (srpkovité anemie, β -talasemie, X-vázané chronické granulomatózní choroby) nebo při modelování jejich molekulární podstaty (pravé polycytémie).

Klíčová slova: iPSCs, reprogramování, hematologická onemocnění, buněčná terapie

ABSTRACT

Induced pluripotent stem cells (iPSC) are one of the key discoveries in cell biology of the last decade. These cells are pluripotent stem cells derived from differentiated somatic cells while having used only four exogenous transcription factors. Pluripotent cells, which can be derived from somatic cells carrying genetic mutation, have a great potential to be used in the testing of new drugs and in discovering molecular mechanisms of genetic disorders. iPSC derived from healthy cells can be used in regenerative medicine. Originally, retroviral vectors were used for delivering reprogramming transcription factors to cells. However such approach is not safe for medicinal use, because of the ability of retroviruses to integrate into the host genome. This fact initiated development of safer delivering methods of transcription factors into the cells.

In this work I present the overview of methods which have been used for reprogramming including the most common techniques used to test pluripotency. In addition, I will describe iPSC application options for therapy of genetically determined hematological disorders (sickle cell anemia, β -thalassemia, X-linked chronic granulomatous disease) and for modelling of their molecular mechanism (polycythemia vera).

Key words: iPSC, reprogramming, hematological disorders, cell therapy

Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Klonování	1
1.2	Buněčná fúze	3
1.3	Transdukce transkripčních faktorů.....	3
2	Příprava iPSCs	4
2.1	Vybrané nejpoužívanější metody testování pluripotence.....	4
2.1.1	Genové fúzní systémy	4
2.1.2	Testování na přítomnost proteinů charakteristických pro ESCs	5
2.1.3	Molekulárně biologické změny v buňce.....	5
2.1.4	Formování teratomů (Teratoma formation)	5
2.1.5	Mikroinjekce do blastocysty.....	5
2.1.6	Tetraploidní komplementace.....	6
2.2	Virové vektory.....	6
2.2.1	Retroviry.....	6
2.2.2	Lentiviry, inducibilní a vystřižitelné lentiviry.....	7
2.2.3	Adenoviry	8
2.2.4	Sendai viry	9
2.3	Nevirové vektory	10
2.3.1	PiggyBac transpozon	10
2.3.2	Neintegrativní cirkulární vektory – plasmid, minikroužek, oriP/EBNA1 vektor..	11
2.3.3	RNA.....	12
2.3.4	Proteiny	13
2.3.5	Malé molekuly.....	13
3	Možnosti využití iPSCs při léčbě hematologických poruch.....	15
3.1	Srpkovitá anémie (SCD, sickle cell disease)	15
3.2	β-talasemie	17
3.3	X-vázaná chronická granulomatózní choroba (X-CGD, X-linked chronic granulomatous disease).....	18
3.4	Pravá polycytémie (PV, Polycythemia vera)	19
4	Závěr	21
5	Seznam použitých zkratk	23
6	Seznam obrázků a tabulek.....	23
7	Použitá literatura	24

1 Úvod

Během raného vývoje zárodku vzniká z oplozeného vajíčka, zygoty, nejprve morula a následně blastula, neboli blastocysta, která se skládá z trofoblastu a vnitřní buněčné hmoty (ICM, inner cell mass). ICM je tvořena embryonálními kmenovými buňkami (ESCs, embryonic stem cells), které jsou pluripotentní, což znamená, že mají potenciál dát vznik nejprve buňkám všech tří zárodečných vrstev, ektodermu, mezodermu a endodermu, a následně se specializovat a diferencovat do všech buněčných typů vyvíjejícího se embrya. (Yamanaka and Blau 2010)

Dlouho se vědci domnívali, že diferenciační proces kmenových buněk je jednosměrný a nevratný a že buňka během něj nenávratně umlčuje či dokonce ztrácí genetickou informaci. (Morris and Daley 2013)

Tato teorie byla úspěšně vyvrácena v padesátých letech dvacátého století, kdy byla vyvinuta metoda, která se nazývá přenos jader tělních buněk (SCNT, somatic cell nuclear transfer) neboli klonování (clonning), (Briggs and King 1952) jež ukázala, že je možné navrátit transkripční profil diferencované buňky do dediferencovaného stavu. Další metody umožňující dediferenciaci jsou jaderná fúze a transdukce transkripčních faktorů.

Ve své bakalářské práci nejprve stručně představím první dvě výše zmíněné metody a poté detailněji popíšu třetí metodu. Ta v principu umožňuje přímo dopravit do buněk geny, jejichž proteinové produkty způsobí navození pluripotentního stavu. Porovnám v současnosti užívané možnosti dopravy těchto genů, případně jejich produktů, do buněk s ohledem na míru zásahu do genomu reprogramované buňky, výtěžnost a rychlost reprogramování. Následně zmíním možnosti využití takto získaných pluripotentních buněk na příkladech vybraných hematologických onemocnění.

Návrat terminálně diferencovaných buněk do předcházejících vývojových stádií se může odehrát dvěma způsoby. Buď buňka přejde skokově do pluripotentního stavu, nebo se postupně navrácí do jednotlivých progenitorových stádií. První možnost se označuje jako reprogramování a druhá jako dediferenciace. (Morris and Daley 2013) Pro účel této práce však budu termíny dediferenciace a reprogramování považovat za záměnné, přičemž budou pokaždé označovat uvedení buněk do pluripotentního stavu.

1.1 Klonování

Metodu klonování jako první publikovali R. Briggs a T. J. King v roce 1952. (Briggs and King 1952) Vyvinuli ji primárně za účelem zjistit, zda jádra diferencovaných buněk ireversibilně ztrácí, či si ponechávají v průběhu diferenciace genetickou informaci a tak i potenciál dát vzniknout celému organismu. Metoda spočívá ve vložení jádra diferencované somatické buňky do neoplozené samičí pohlavní buňky zbavené jádra, enukleované.

Jako modelový organismus použili obojživelníka *Rana pipiens* (skokan levhartí). Neoplozená vajíčka enukleovali pomocí Porterovy techniky následně do nich vpravili jádra získaná z buněk pozdní blastuly vyvíjejícího se pulce. Z těchto vajíček s vyměněnými jádry se vyvinuli životaschopní pulci. Použití jader buněk pozdějších vývojových stádií než je stadium pozdní blastuly již po přenosu

do enukleovaného vajíčka k vývoji pulců nevedlo. Nicméně nová metoda přenosu buněčných jader byla v principu použitelná pro další výzkum. (Briggs and King 1952)

O několik let později publikoval podobný experiment John B. Gurdon (Elsdale, Gurdon, and Fischberg 1960), použil ale jiný druh obojživelníka, *Xenopus laevis* (drápatka vodní), ve vajíčkách určených k vložení jádra somatické buňky inaktivoval haploidní jádra tak, že je vystavil krátkému ozáření ultrafialovým světlem, což byl šetrnější způsob než ten, který použili Briggs a King, (Briggs and King 1952) jelikož tím pouze inaktivoval pronukleus, ale jinak vajíčko nepoškodil. (Elsdale, Gurdon, and Fischberg 1960) Do ozářených vajíček následně injikoval jádra pocházející z buněk střevního epitelu pulce. Provedl celkem 726 jaderných přenosů, ale získal pouze 10 životaschopných pulců. I při takto malé výťažnosti definitivně prokázal, že i terminálně diferencované buňky si udržují veškerou genetickou informaci a jsou schopny dát vznik celému organismu. (Elsdale, Gurdon, and Fischberg 1960) Přestože tento revoluční objev mohl vést k rychlému rozvoji klonování, došlo k dalšímu významnému pokroku v této oblasti až o několik desítek let později, a to v druhé polovině devadesátých let dvacátého století, kdy tým vědců pod vedením Iana Wilmuta publikoval článek o úspěšném naklonování prvního savce, slavné ovce Dolly, která se narodila jako jediná z výchozích 277 oocytů. (Wilmut et al. 1997)

Následně bylo naklonováno velké množství dalších živočišných druhů včetně myši. Byla také naklonována řada hospodářských a ohrožených divokých zvířat, která byla naklonována ze zmražených vzorků tkání za účelem testování možnosti využití SCNT k záchraně druhů, kterým hrozí vyhynutí. (Yamanaka and Blau 2010) Stejně tak byla jako zdroj jader použita celá řada diferencovaných buněčných typů např. leukocyty, hepatocyty, myocyty, neurony a mnohé další. (Minal Patel & Shuying Yang 2011)

I přes dosavadní úspěchy má klonování stále nízkou účinnost dosahující maximálně 2 % a navíc se u klonovaných jedinců vyskytuje řada abnormalit, které se souhrnně označují jako syndrom velkého potomstva (LOS, large offspring syndrome), jenž se projevuje například obesitou, poškozeným imunitním systémem, větší náchylností ke vzniku tumorů, dýchacími obtížemi, zvětšenými orgány, prodlouženou dobou březosti, problémy při porodu a smrt klonovaného jedince po porodu. (Blau, Chiu, and Webster 1983) (X. Yang et al. 2007)

Pro LOS je také typická defektní placenta, jejíž dysfunkce může být příčinou výše zmíněných problémů spojených s LOS. Tuto teorii podporuje poznatek, že komplementace tetraploidních embryí diploidními embryonálními kmenovými buňkami vzniklými klonováním (ntESCs, nuclear transfer embryonic stem cells), kdy tetraploidní buňky tvoří pouze placentu a diploidní vlastní embryo, má účinnost až 20 - 30 %, což je v porovnání s 2% účinností klasického klonování výrazně více. Příčinou aberantního vývoje placenty je s největší pravděpodobností nedokonalá remodelace epigenetické paměti buněk tvořících trofoektoderm klonované blastocysty. (X. Yang et al. 2007) Dále se u klonovaných jedinců vyskytují i některé defekty na molekulární úrovni jako například odlišná genová exprese, aktivita telomerázy či poruchy epigenetické regulace a to i přes snahy najít takové podmínky, ve kterých bude klonování účinnější a abnormality budou eliminovány. (Yamanaka and Blau 2010)

Přestože existuje potenciál pro využití klonování i v lidské regenerativní medicíně, jádra lidských buněk zatím pro klonování použita nebyla. Kromě etické otázky, která je samozřejmě na místě, vyvstává i problém získávání použitelných oocytů. V úvahu přichází jejich derivace *in vitro* nebo

použití oocytů jiného živočišného druhu, například prasete. Další možností je jejich získávání od dárcyň, ale to by byl nejnáročnější způsob.

1.2 Buněčná fúze

Další metodou jak uměle změnit transkripční profil jádra diferencované buňky je buněčná fúze (CF, cell fusion). Ta se dnes provádí například pomocí polyethylenglykolu (PEG, polyethyleneglycol) (J. Yang and Shen 2006) nebo ji také lze provést prostřednictvím virů (Ringertz et al. 1971). Produktem buněčné fúze jsou buď „buněční hybridy“ (cell hybrids) nebo „heterokaryonti“ (heterokaryons).

Pokusy s buněčnými hybridy jsou prováděny již od šedesátých let dvacátého století. Pomocí této metody byla například objevena existence trans represorů a tumor supresorových proteinů. (Yamanaka and Blau 2010) Buněční hybridy mají sfúzovaná jádra a dělí se, což může vést ke ztrátám chromozomů, pochází-li fúzované buňky každá z jiného druhu. Navodit reprogramování diferencované somatické buňky lze pomocí tvorby hybridu s embryonální kmenovou buňkou, jelikož ta obsahuje v cytoplasmě transkripční faktory, které mají schopnost udržet a zachovat pluripotentní stav. Pomocí CF byly úspěšně reprogramovány například primordiální zárodečné buňky (S. Tada et al. 1997), tymocyty (M. Tada et al. 2001) a myeloidní prekursory (J. Yu and Thomson 2006).

Heterokaryonti jsou vícejaderné nedělící se buňky, jejichž jádra spolu nesfúzovala, ale zůstávají oddělená, podobný buněčný útvar vytváří přirozeně například buňky kosterního svalu, které jsou sfúzovány do syncytia. Artificiálně vytvoření heterokaryonti obvykle obsahují jádra ze dvou různých živočišných druhů, např. myši a člověka, aby bylo možno odlišit, ze kterého jádra pochází exprimovaný genový produkt. Uměle připravení heterokaryonti slouží primárně k výzkumu regulace genové exprese pomocí transkripčních faktorů. Například práce z roku 1983 ukázala, že při fúzi vícejaderného myšního myocytu s lidskou amniotickou buňkou došlo k expresi lidských svalových proteinů, což vedlo k závěru, že faktory regulující genovou expresi jsou přítomné i v buněčné cytoplasmě a mohou vstupovat do jádra. (Blau, Chiu, and Webster 1983)

1.3 Transdukce transkripčních faktorů

Tuto historicky nejmladší metodu jak dediferencovat somatické buňky poprvé představili Shinya Yamanaka a Kazutoshi Takahashi v roce 2006, (Takahashi and Yamanaka 2006) kdy publikovali výsledky svého experimentu, jež vedly k překvapivému zjištění, že k navození pluripotence somatických buněk mohou stačit pouze 4 reprogramující faktory. Připravené dediferencované buňky nazvali indukovanými pluripotentními kmenovými buňkami, iPSCs. Fakt, že je možné *in vitro* relativně snadno přeprogramovat terminálně diferencovanou somatickou buňku na buňku s vlastnostmi podobnými buňce kmenové, otevírá nové možnosti využití takto připravených buněk ve výzkumu a následně v regenerativní medicíně. Ve své práci se budu nejdříve věnovat dnes používaným možnostem transdukce těchto genů do somatických buněk a poté příkladům využití iPSCs v terapii geneticky podmíněných poruch krvetvorby.

2 Příprava iPSCs

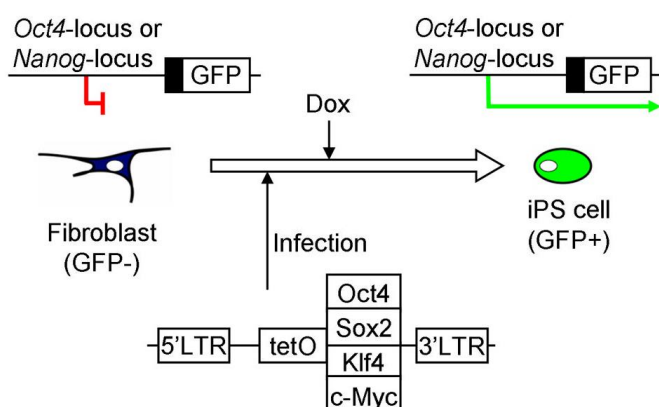
Chceme-li derivovat z diferencovaných somatických buněk iPSCs, je třeba zohlednit několik faktorů, které mají vliv na proces dediferenciace. Patří mezi ně například volba buněčného typu, počtu a kombinace reprogramujících faktorů. (Maherali and Hochedlinger 2008) Za klíčový však považují výběr vhodné metody dopravení faktorů do buněk, jež výrazně ovlivní výtěžnost a částečně kvalitu získaných iPSCs a tak i jejich potenciál aplikovaného využití. Proto se v první části své bakalářské práce zaměřím na principiální popis jednotlivých dosud publikovaných metod reprogramování a porovnáám jejich výhody a nevýhody vzhledem k ostatním metodám.

Než jednotlivé metody dopravení reprogramujících transkripčních faktorů do buněk popíšu, tak stručně zmíním nejpoužívanější metody posuzování pluripotence buněk, které jsou používány i k posouzení pluripotence připravených iPSCs. Tyto metody v principu buď posuzují transkripční profil iPSCs a porovnávají jej s transkripčním profilem ESCs nebo testují jejich potenciál diferencovat v buňky všech tří zárodečných linií. Testování pluripotence je nezbytné pro posouzení kvality získaných iPSCs.

2.1 Vybrané nejpoužívanější metody testování pluripotence

2.1.1 Genové fúzní systémy

Principem této metody je příprava fúzní genové kazety v cílové diferencované buňce. Fúzní kazeta se skládá z endogenního genu exprimovaného v pluripotentním stavu, např. Oct4, Nanog (Brambrink et al. 2008) či Fbx15 (Takahashi and Yamanaka 2006), který je expresně spojen s reportérovým genem, např. neomycinovou rezistencí nebo zeleným fluorescenčním proteinem (GFP, green fluorescence protein). Dojde-li k dediferenciaci buňky aspoň do takové míry, aby se začal tento endogenní protein exprimovat, exprimuje se s ním i připojený reportérový protein, který buňce přináší pozorovatelný fenotypový projev, na základě kterého lze reprogramované buňky selektovat (viz Obrázek 1).



Obrázek 1: Schematické znázornění funkce genového fúzního systému: Po aktivaci exprese transkripčních faktorů dojde k expresi genu Oct4 nebo Nanog a s ním i k expresi GFP, který umožní reprogramované buňky selektovat. (Brambrink et al. 2008)

2.1.2 Testování na přítomnost proteinů charakteristických pro ESCs

Nejčastěji se testuje přítomnost alkalické fosfatázy (AP, alkaline phosphatase) tak, že se zjišťuje její enzymatická aktivita např. (Maherali et al. 2007), (Takahashi et al. 2007), (Li et al. 2011), a fázově specifického embryonálního antigenu 1 (SSEA1, stage specific embryonic antigen 1) např. (Wernig et al. 2007), (Carey et al. 2009), (Matthias Stadtfeld et al. 2008), jehož přítomnost se testuje pomocí protilátek. Na druhou stranu lze také testovat přítomnost proteinů, které se nenachází v pluripotentních kmenových buňkách, ale pouze v použitém výchozím typu somatických buněk. Příkladem může být povrchová molekula Thy1, která se nachází na povrchu fibroblastů a lze ji detekovat pomocí protilátek. (Matthias Stadtfeld et al. 2008) Její nepřítomnost na povrchu buňky pak indikuje dediferenciaci.

2.1.3 Molekulárně biologické změny v buňce

Při návratu z diferencovaného do pluripotentního stavu prochází buňka řadou změn na úrovni remodelace chromatinu, methylace DNA a globálních změn genové exprese. (Mikkelsen et al. 2008) Sledování těchto změn a porovnání výsledného stavu s ESCs a výchozím buněčným typem slouží ke zhodnocení míry dediferenciace iPSCs. Sleduje se například methylace CpG dinukleotidů ve vybraných promotorových oblastech, která má vliv na aktivitu daného promotoru (Mikkelsen et al. 2008). Celkový transkripční profil lze popsat pomocí microarrays (Fusaki et al. 2009) nebo polymerázové řetězové reakce spojené s reverzní transkripcí (RT-PCR, reverse transcription – polymerase chain reaction) např. (Takahashi and Yamanaka 2006), (Brambrink et al. 2008), (Carey et al. 2009). Výhodou RT-PCR je možnost odlišit transkripci endo- a exogenních genů. Pomocí imunoprecipitace chromatinu (ChIP, chromatin immunoprecipitation) např. (Wernig et al. 2007), (Judson et al. 2009) lze popsat modifikace histonů, acetylaci a metylaci, které mají vliv na umlčování a aktivaci genů. Při posuzování pluripotence sledujeme histony v oblasti genů aktivních v kmenových buňkách.

2.1.4 Formování teratomů (Teratoma formation)

Cílem této metody je zjistit, zda připravené dediferencované buňky mohou diferencovat v buňky všech tří zárodečných vrstev a mohou tak být označeny za pluripotentní. např. (Takahashi and Yamanaka 2006), (Takahashi et al. 2007), (Okita, Ichisaka, and Yamanaka 2007), V praxi se provádí injekcí připravených iPSCs subkutánně do imunosuprimované myši. Jsou-li buňky pluripotentní, formují teratomy, což jsou nádory tvořené z buněk všech tří zárodečných vrstev. Buňky, ze kterých se skládají tyto nádory, jsou pak testovány na přítomnost proteinů charakteristických pro danou zárodečnou vrstvu pomocí protilátek.

2.1.5 Mikroinjekce do blastocysty

Mikroinjekcí do blastocysty lze také testovat potenciál iPSCs diferencovat na různé buněčné typy *in situ*. např. (Takahashi and Yamanaka 2006), (Wernig et al. 2007), (Okita, Ichisaka, and Yamanaka

2007) Do vyvíjející se blastocysty jsou injikovány iPSCs a následně se zjišťuje na starších embryích podíl původních iPSCs na tvorbě různých tkání. Pro mikroinjekci se využívají iPSCs označené například pomocí exprese GFP, aby je bylo možné odlišit od původních buněk blastocysty.

2.1.6 Tetraploidní komplementace

Jedná se o mikroinjekci iPSCs do tetraploidní blastocysty (Woltjen et al. 2013). Tetraploidní buňky dají vznik pouze trofoektodermu, zatímco diploidní iPSCs budou tvořit vnitřní buněčnou hmotu. Tato metoda je podrobněji popsána výše v kapitole Klonování. K úspěšnému vývoji embrya dojde jen v případě použití kvalitně reprogramovaných iPSCs.

2.2 Virové vektory

2.2.1 Retroviry

K dopravení reprogramujících faktorů do buněk byly jako úplně první využity retrovirové vektory. Yamanaka a kol. je použili ve svém původním experimentu, jehož cílem bylo nalézt dostačující kombinaci reprogramujících faktorů, která by reprogramovala buňky do pluripotentního stavu (Takahashi and Yamanaka 2006). Experiment provedli následovně:

Využili linii myších embryonálních fibroblastů (MEF, mouse embryonic fibroblast), které měly v obou lokusech genu *Fbx15* (také *Fbxo15*) umístěnou β -geo kazetu nesoucí rezistenci vůči antibiotiku G418. Gen *Fbx15* je exprimovaný v nediferencovaných embryonálních kmenových buňkách, ale pro udržení pluripotence není nezbytný. V experimentu sloužila vložená rezistenční kazeta jako pozitivní selekční marker těch buněk, které se podařilo reprogramovat, protože exprese rezistenční kazety umožnila dediferencovaným buňkám tvořit kolonie i v médiu s velmi vysokou koncentrací antibiotika G418.

Do takto upravených buněk vnesli pomocí retrovirových vektorů současně 24 vybraných genů, o kterých se domnívali, že jejich exprese může vést k navození pluripotentního stavu. Zároveň vnesli do buněk každý z těchto 24 genů jednotlivě. Zjistili tak, že exprese všech 24 genů současně diferenciaci způsobí, zatímco ani jeden z produktů těchto genů ji nevyvolá sám.

V následujícím kroku transdukovali buňky pouze 23 faktory tak, že vždy jeden z 24 vybraných faktorů vynechali. Deset faktorů, jejichž vynechání nevedlo k rezistenci vůči G418 a tvorbě kolonií – dosažení dediferencovaného stavu, bylo vybráno do další fáze experimentu, jelikož se ukázalo, že jejich přítomnost může být pro dediferenciaci klíčová.

Následně transdukovali těchto vybraných 10 faktorů společně, což se bylo pro dediferenciaci dostačující. Opět z této desítky faktorů eliminovali jeden a sledovali vliv nepřítomnosti tohoto faktoru na účinnost reprogramování. Takto nakonec získali čtyři faktory, bez nichž se reprogramování neuskuteční a které zároveň k reprogramování dostačují. Jedná se o transkripční faktory Oct3/4, Klf4, Sox2 a c-Myc.

iPSCs následně zhodnotili z hlediska exprese endogenních pluripotentních markerů, modifikace histonů, metylace CpG sekvencí, aktivity telomerázy a pozitivitu na AP a SSEA-1. Na základě

srovnání iPSCs a ESCs dospěli k závěru, že iPSCs jsou svými vlastnostmi podobné ESCs, ale nejsou zcela identické.

In vitro formovaly kolonie připravených iPSCs na Petriho miskách embryoidní tělíska (EB, embryoid bodies), která byla pozitivní na marker ektodermu (α -fetoprotein), mezodermu (α -aktin hladkého svalu) i endodermu (β III tubulin), navíc iPSCs injikované subkutánně do imunosuprimované myši úspěšně formovaly teratomy. Stejně úspěšná byla i mikroinjekce iPSCs označených pomocí GFP do blastocysty, avšak takto připravená chimérická embrya se nevyvinula v dospělé jedince.

O rok později byl publikován článek popisující dediferenciaci lidských dermálních buněk prostřednictvím stejných 4 faktorů také dopravených retrovirem. (Takahashi et al. 2007)

Za klíčový objev, že diferencované buňky mohou být reprogramovány do pluripotentního stavu, obdržel Shinya Yamanaka společně s Johnem Gurdonem v roce 2012 Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu.

Analogický postup využívající retrovirové vektory byl úspěšně použit pro další následné derivace iPSCs i z myších fibroblastů. (Maherali et al. 2007), (Wernig et al. 2007), (Okita, Ichisaka, and Yamanaka 2007) V těchto případech byl však jako selekční marker pluripotence použit gen Nanog, který je pro pluripotentní stav buněk esenciální na rozdíl od Fbx15 použitého Yamanakou. Exprese tohoto genu byla spojena s antibiotikovou (konkrétně neomycinovou) rezistencí a zároveň infikované buňky byly selektovány po delší době od transdukce. (Maherali et al. 2007)

Takto selektované iPSCs formují po injikaci do imunosuprimované myši teratomy, podílejí se na vývoji životaschopných chimérických myší a buněk zárodečné linie v nich. (Maherali et al. 2007), (Wernig et al. 2007), (Okita, Ichisaka, and Yamanaka 2007) Avšak některé z chimérických myší byly postiženy tvorbou nádorů díky reaktivaci exogenního c-Myc. (Okita, Ichisaka, and Yamanaka 2007) Transkripční a epigenetický profil připravených iPSCs byl téměř shodný s profilem ESCs, lišil se méně než profil buněk selektovaných pomocí Fbx15. (Maherali et al. 2007)

Největšími nevýhodami celého postupu jsou relativně nízká účinnost pohybující se v rozmezí 0,01- 0,5 % (Wernig et al. 2007), (Okita, Ichisaka, and Yamanaka 2007) a fakt, že v infikovaných buňkách se virové vektory integrují do buněčného genomu a to i ve více kopiích (Wernig et al. 2007), což činí takto připravené iPSCs nepoužitelné pro regenerativní medicínu, a to i přes to, že kmenové buňky včetně iPSC dokáží umlčovat proviry integrované do svého genomu. Může totiž dojít k jejich reaktivaci a následná transkripce reprogramujícího faktoru může vést ke vzniku tumorů. (Okita, Ichisaka, and Yamanaka 2007) Také nelze vyloučit integraci do aktivního genu, jelikož se retroviry integrují náhodně. (Varas et al. 2009)

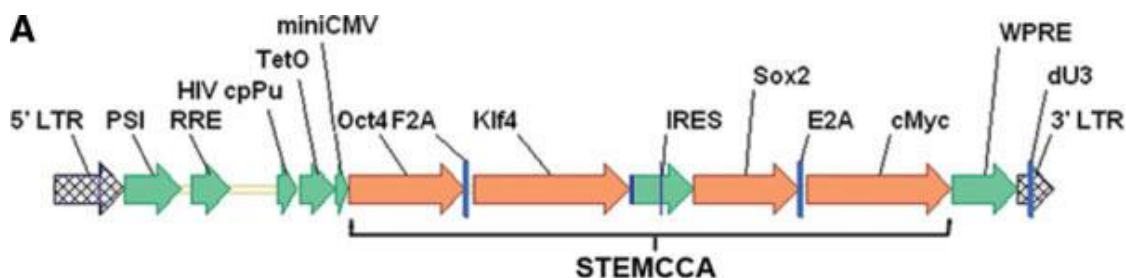
Závislost účinnosti reprogramování buňky na místech inserce retroviru do genomu prokázána nebyla. (Varas et al. 2009)

2.2.2 Lentiviry, inducibilní a vystřižitelné lentiviry

Druhou možností jak dopravit reprogramující geny do buňky představují lentiviry. Jedná se o integrující virové vektory, jejichž výhodou oproti retrovirům je možnost zkonstruovat takový vektor, který ponese všechny reprogramující faktory současně v jedné kazetě, což snižuje celkový počet nutných insercí vektoru do cílového genomu až na jednu, která je pro úplnou dediferenciaci

dostačující. Avšak takovéto kazety jsou v dediferencovaných buňkách umlčovány méně efektivněji než retrovirové inserty. (M. Stadtfeld and Hochedlinger 2010) Tento problém obchází možnost konstrukce inducibilních systémů, kdy je třeba dodat k buňkám do média induktor např. tetracyklin, aby se kazeta s transkripčními faktory začala exprimovat. Takovéto uspořádání experimentu pak umožňuje sledovat kinetiku dediferenciačního procesu v čase. (Brambrink et al. 2008), (Carey et al. 2009) Lze také z chimérní myši, která se vyvinula z blastocysty s injikovanými iPSCs, odebrat buňky nesoucí v genomu inducibilní reprogramující lentivirovou kazetu a ty opětovně dediferencovat pouze přidáním induktoru. (Sommer et al. 2009)

Konkrétním příkladem lentivirového vektoru je například vektor pHAGE-STEMCCA použitý C. A. Sommerem a kol. (viz Obrázek 2). (Sommer et al. 2009) Přepisem tohoto vektoru vznikne jedna polycistronní mRNA obsahující dva fúzní proteiny oddělené místem pro vnitřní nasednutí ribosomu (IRES, internal ribosome entry site), které je virového původu. V jednotlivých proteinech se pak nachází sekvence oddělující úseky kódující reprogramující faktory kódující F2A nebo E2A peptid, který katalyzuje autovystřížení (self-cleavage) na proteinové úrovni.



Obrázek 2: Mapa lentivirového vektoru STEMCCA nesoucího všechny 4 reprogramující faktory. Po transkripci vznikne jedna polycistronní mRNA se dvěma cistrony oddělenými IRES sekvencí. Dva vzniklé proteinové produkty se po translaci samy naštěpí ve 2A sekvencích. (Sommer et al. 2009)

Pro dopravení reprogramující kazety do buněk lze také využít sebeinaktivující (SIN, self-inactivating) lentivirový vektor, který umožní odstranění insertu z genomu buňky po dosažení pluripotentního stavu. (Chang et al. 2009) Insert obsahuje na okrajích loxP místa, která umožňují vyštěpení Cre rekombinázou. Tu lze do dediferencovaných buněk dodat pomocí adenovirového vektoru nebo elektroporací plasmidu, který ji kóduje, přičemž transientní exprese rekombinázy je dostačující k tomu, aby došlo k excisi vložené kazety. V genomu však zůstanou krátké sekvence z úplných okrajů insertu. Pro následné experimentální či terapeutické použití takto připravených iPSCs lze vybrat jen ty klony, které nemají toto reziduum v kódujících sekvencích. Tato metoda přípravy iPSCs byla autory pojmenována jako „hit and run“ (udeř a běž).

2.2.3 Adenoviry

Metodu reprogramování pomocí adenovirů, což jsou dsDNA neintegrující se viry, poprvé použili M. Stadtfeld a kol. na myších jaterních buňkách s cílem zjistit, zda je možné buňky dediferencovat i bez virové inserce do genomu. (Matthias Stadtfeld, Masaki Nagaya, Jochen Utikal, Gordon Weir 2014) Nevýhodou použitého postupu je, že adenovirový vektor může nést gen pouze pro jeden

reprogramující faktor, je tedy potřeba, aby se v jedné buňce sešly vektory nesoucí všechny 4 geny současně, k čemuž v experimentu došlo u 50 – 60 % transdukovaných buněk. Také dochází k postupnému vyředování vektorů z kultury v čase v důsledku dělení buněk, což vede k extrémně nízké účinnosti v rozmezí 0,0001 – 0,001 %. Dále autoři zaznamenali, že 3 ze 13 získaných kolonií iPSCs obsahují tetraploidní buňky. Spekuluji, že díky přítomnosti adenovirového vektoru došlo k fúzi buněk nebo že jsou preferenčně infikované tetraploidní buňky, které již byly přítomné v původní kultuře. S velice nízkou frekvencí se adenoviry mohou integrovat do genomu, avšak bylo ověřeno, že v připravených liniích k integraci nedošlo

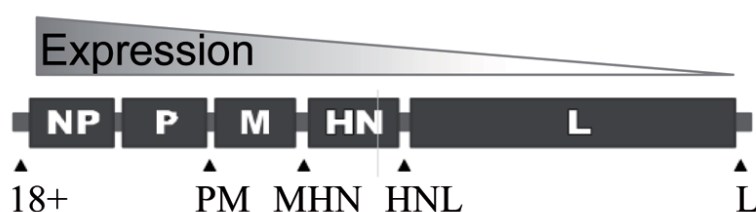
Svými vlastnostmi se iPSCs připravené pomocí adenovirových vektorů výrazně nelišily od iPSCs připravených pomocí retrovirů. U dospělých chimérních myši připravených injekcí iPSCs do blastocysty se nevyvinuly žádné tumory. (Matthias Stadtfeld, Masaki Nagaya, Jochen Utikal, Gordon Weir 2014)

O rok později se vědcům povedlo pomocí adenovirových vektorů dediferencovat lidské embryonální fibroblasty s podobně nízkou účinností aniž by byly pozorovány tetraploidní iPSCs, což ale může být způsobeno tím, že v experimentu byly ustanoveny pouze 3 buněčné linie. (W. Zhou and Freed 2009)

2.2.4 Sendai viry

Poslední virový vektor, o kterém se ve své práci zmíním a který byl použit k reprogramování buněk, je Sendai virus. (Fusaki et al. 2009) Jedná se o -ssRNA virus, který nevstupuje do buněčného jádra, ale vyskytuje se pouze v cytoplasmě. Navíc neprochází DNA fází, což znamená, že nemůže dojít k jeho integraci do genomu. Při použití Sendai virového vektoru lze také využít efektu transkripční polarizace, díky níž geny vložené na 3' konci genomové -ssRNA jsou transkribovány častěji než geny vložené k blíže k 5' konci (viz Obrázek 3). To umožňuje sledovat závislost účinnosti reprogramování nejen na celkové koncentraci ale i poměru reprogramujících faktorů a zvolit tak uspořádání, které přinese největší výtěžnost. Jako nejúčinnější se ukázalo vložení všech 4 faktorů do HNL místa na vektoru.

Podobně jako v případě adenovirových vektorů je nutné dopravit každý reprogramující faktor na virovém vektoru zvlášť a z kultury lze vektory odstranit vyředováním, ke kterému dochází při pasážování. Na rozdíl od adenovirových vektorů má využití Sendai virového vektoru výrazně vyšší účinnost dosahující 1 % v lidských buňkách a výsledné iPSCs také splňují podmínky pluripotence.



Obrázek 3: Schematické zobrazení Sendai virového vektoru. Trojúhelník nad vektorem znázorňuje relativní míru exprese exogenního insertu v závislosti na jeho poloze na vektoru (Fusaki et al. 2009)

Obecně použití všech virových vektorů zahrnuje krok přípravy infekčních virionů nesoucích nukleovou kyselinu v pomocných buňkách, což je na přípravu náročnější proces než dopravení exogenní genetické informace do buněk pomocí např. lipofekce, kterou lze využít například při použití plasmidů (viz níže).

2.3 Nevirové vektory

2.3.1 PiggyBac transpozon

PiggyBac transpozon je nereplikativní mobilní genetický element původem z hmyzích buněk. (Wilson, Coates, and Jr 2007) Na jeho okrajích se nachází přímé repetice, mezi které lze umístit přenášenou DNA sekvenci dlouhou až 10 kbp. Pomocí transpozázy se integruje do TTAA sekvencí v genomu a po vyštěpení zanechává genomovou DNA beze změny. Do buněk je nutno transpozon transfekovat spolu s expresním vektorem nesoucím piggyBac transpozázu, která je nezbytná k integraci transpozonu do genomu. Účinnost transfekce se pohybuje kolem 10 %. Pro úspěšné reprogramování je třeba aspoň dvou integrací transpozonu do genomu. Výhodou tohoto systému je možnost přenést všechny faktory do buňky v jedné kazetě oddělené pomocí 2A peptidu (viz Obrázek 4) a podobně jako v případě lentiviru, translací vznikne jeden protein, který se následně sám naštěpí.

Je také možné transfekovat buňky více transpozony, kdy každý nese pouze jeden faktor. Takovýto postup však není výhodný, jelikož je nutné, aby se v buňce sešly všechny 4 transpozony a následně byly všechny odstraněny. (Woltjen et al. 2013) Oběma způsoby lze ale získat rovnocenné iPSCs.

Po dediferenciaci je nutné transpozony z iPSCs odstranit, opět transientní expresí transpozázy, a následně selektovat buňky bez transpozonů. Elegantní způsob selekce představuje pu Δ tk-FIAU selekční systém. (Yusa et al. 2009) pu Δ tk je arteficiální fúzní protein, který je součástí transpozonu a buňky, které jej exprimují, jsou citlivé k látce FIAU. Po působení transpozázy přežijí v médiu obsahujícím FIAU jen ty buňky, které neobsahují transpozon, tudíž pu Δ tk neexprimují. Účinnost odstranění transpozonu je velice nízká 0,001 % a navíc je závislá na místě integrace, což snižuje celkovou výtěžnost procesu. (Woltjen et al. 2013)

Autoři, kteří také tento transpozon k reprogramování použili, přidali ke čtyřem obvyklým faktorům navíc gen pro faktor Lin28, který byl k reprogramování použit již dříve v kombinaci s faktory Oct4, Sox2 a Nanog. (J. Y. Yu et al. 2007) Tím zvýšili účinnost dediferenciace téměř dvakrát v porovnání s dediferenciací pouze pomocí 4 původních faktorů. (Yusa et al. 2009)

Výhodou tohoto systému je oproti Sendai a adeno virovému vektoru, že nedochází k jeho vyředování z kultury, a oproti lentiviru to, že po excisi zachová integrační místo beze změny. Na druhou stranu zahrnuje tento postup krok navíc, odstranění transpozonu, což snižuje celkovou účinnost a zvyšuje náročnost procesu.



Obrázek 4: Mapa piggyBac transpozonu nesoucího všechny čtyři transkripční faktory a puΔtk selekční marker. (Yusa et al. 2009)

2.3.2 Neintegrativní cirkulární vektory – plasmid, minikroužek, oriP/EBNA1 vektor

Jako první úspěšně použili plasmidový vektor K. Okita a kol. v roce 2008. (Okita et al. 2008) Nepodařilo se jim však sestavit takový vektor, který by dokázal dediferencovat použité MEF a zároveň nesl všechny 4 reprogramující faktory současně. Použili proto dvojici plasmidů, přičemž jeden nesl cDNA pro c-Myc a druhý pro zbylé 3 faktory oddělené sekvencí pro 2A peptid. Uspořádání jejich experimentu ukázalo, že nejúčinnější je transfekovat buňky oběma plasmidy současně. Avšak z důvodu vyředování plasmidů z kultury je nutná jejich opakovaná transfekce. Transfekovali tedy buňky celkem čtyřikrát každý druhý den. Následná analýza připravených iPSCs odhalila, že v několika z vybraných kolonií došlo k inzerci plasmidu do genomu, ale ve většině kolonií získaných pluripotentních buněk nebyla integrace plasmidu do genomu nalezena, což poukazuje na schopnost této dvojice vektorů dediferencovat buňky bez nutnosti jejich integrace. Kromě příležitostné integrace je další nevýhodou nízká účinnost, která se pohybuje v řádu tisícín procenta.

Podobný plasmidu je minikroužek (minicircle). (Jia et al. 2010) Jedná se o upravený plasmid, ze kterého byla před vnesením do cílových buněk odstraněna ta část, která je potřebná pro replikaci a udržení plasmidu v bakteriích. Výsledná molekula DNA je tedy menší než původní plasmid, a tak se účinněji transfekuje do buněk a zároveň je v nich exprimována déle, což teoreticky implikuje větší účinnost. Podobně jako u plasmidů i v případě minikroužků dochází k jejich vyředování v důsledku proliferace buněk, a proto je rovněž nutná opakovaná transfekce. Pomocí minikroužku nesoucího kombinaci faktorů, Lin28, Nanog, Sox2 a Oct4, oddělených 2A peptidem se podařilo dediferencovat lidské adipózní kmenové buňky s účinností 0,005 %, aniž by byla zaznamenána integrace minikroužku do genomu. Při použití neonatálních fibroblastů byla účinnost dediferenciace desetkrát menší, což poukazuje na závislost účinnosti reprogramování na výchozím buněčném typu.

Největší nevýhodou předchozích neintegrativních vektorů je jejich postupné vyředování z kultury. Tento nedostatek obchází oriP/EBNA1 vektor, který se díky oriP a genu pro EBNA1 protein dokáže sám replikovat v buňce, ale pouze jedenkrát za buněčný cyklus. (J. Y. Yu et al. 2007) Pomocí pozitivního selekčního markeru neseného vektorem, lze v médiu selektovat jen ty buňky, které vektor obsahují. Naopak po dosažení pluripotentního stavu lze díky defektní replikaci vektoru získat kolonie, které jej neobsahují, po odebrání selekčního agens z média. Autoři, kteří tento vektor použili, dediferencovali lidské fibroblasty pomocí šesti dediferenciačních faktorů. Kromě 4 Yamanakových použili ještě Lin28 a Nanog. Jelikož exprese těchto faktorů, hlavně c-Myc, měla na buňky cytotoxický efekt, exprimovali spolu s nimi SV40LT antigen bránící apoptóze. Pomocí této kombinace získali plnohodnotné iPSCs bez integrací vektoru do genomu. Účinnost byla také velice nízká 0,0001 %.

Obecně lze říci, že oproti virovým vektorům lze cirkulární vektory dopravit snadněji do buněk, bez nutnosti zabalení vektoru do virové částice. Naopak jejich největší nevýhodou, kterou sdílí s neintegrujícími virovými vektory, je jejich postupné vyředování z kultury, jenž výrazně snižuje účinnost. To lze ale obejít konstrukcí replikativního plasmidu. Oproti retrovirům, lentivirům a transpozonům není nutná jejich integrace do genomu, což zvyšuje jejich šance na využití v klinické praxi.

2.3.3 RNA

Jelikož použití plasmidových DNA vektorů vždy obnáší jisté riziko jejich náhodné integrace do genomu a krok odstranění transpozonu snižuje celkovou účinnost, byla také vyzkoušena možnost využití přímo mRNA kódujících jednotlivé transkripční faktory. (Warren et al. 2010)

Tato alternativa je ale oproti ostatním metodám relativně náročná na provedení. Zahrnuje totiž krok *in vitro* transkripce, pro kterou je nutné připravit transkribovatelné templáty, a následně vypurifikovat produkty. Navíc exogenní RNA vyvolává v buňkách antivirovou cytotoxickou odpověď v podobě represe translace a produkce interferonů. Za účelem zmírnění takovéto nežádoucí reakce je nutno přidat do média inhibitor interferonové odpovědi. Při syntéze mRNA byly využity modifikované báze (5-methylcytidin místo cytosinu a pseudouridin místo uridinu) a z 5' konců RNA, které neunesly použitý analog 5-methylguanosinové čepičky, byly odstraněny fosfáty. To výrazně snížilo nežádoucí odpověď buněk na přítomnost exogenní RNA, zvýšilo její životnost a tak i množství vytvořených proteinů. Obdobně jako v případech nereplikujících se a neintegrujících vektorů je také nutná opakovaná transfekce.

Jak již bylo uvedeno na začátku, při použití mRNA nehrozí narušení integrity genomu, další výhodou je bezesporu možnost optimalizace stechiometrického poměru jednotlivých faktorů, což systémy využívající tvorbu fúzních proteinů spojených 2A peptidem neumožňují. Nejvíce překvapivé jsou výtěžnost a rychlost metody. Za optimálních podmínek pomocí mRNA pro pětici faktorů Lin28, Oct3/4, Klf4, Sox2 a c-Myc bylo dosaženo až 4,4% účinnosti během 18 dní, přičemž reprogramování za využití ostatních metod trvá zhruba měsíc. Při použití pouze původních 4 faktorů, bez Lin28, je účinnost menší. Připravené iPSCs byly následně diferencovány pomocí mRNA kódující diferenciační faktor MYOD. (Warren et al. 2016)

Kromě mRNA byla k dediferenciaci použita i směs specifických miRNA, které byly při dediferenciaci použity místo faktoru c-Myc, přičemž zbylé 3 faktory byly do buněk dopraveny pomocí retrovirů. (Judson et al. 2009)

Jedná se o směsici miRNA regulujících cyklus embryonálních buněk (ESCsC, embryonic stem cells cycle), které urychlují průchod G₁/S kontrolním bodem cyklu. Autorům se však nepodařilo objasnit přesný mechanismus účinku, ale potvrdili, že působení této směsice miRNA na buňku má jiný efekt než působení faktoru c-Myc. To prakticky demonstrovali tak, že buňky reprogramované pomocí miRNA nebyly schopné na rozdíl od kontrolních buněk formovat teratomy, přestože u nich byla pozorována reaktivace endogenních Oct4, Sox2 a Klf4 zatímco exogenní retrovirové inserty byly umlčeny.

2.3.4 Proteiny

Aby mohly být využity pro dediferenciaci buněk proteiny, je třeba vytvořit vhodný expresní systém a zároveň dopravit proteiny z média do buněk.

První možnost představuje *E. coli* expresní systém umožňující vyprodukovat všechny 4 transkripční faktory opatřené na C koncích 11R polyargininovou signální sekvencí, která umožňuje jejich spontánní průchod přes cytoplasmatickou membránu do buněk. (H. Zhou et al. 2009)

Druhou možnost jak připravit hotové proteiny představuje buněčná linie HEK293. (Kim et al. 2010) V těchto buňkách je také možné cíleně produkovat exogenní proteiny. Výhodou použití těchto buněk je, že lze k reprogramování použít celý buněčný extrakt bez nutnosti purifikace, přičemž do cílových buněk se dostanou pouze proteiny označené lokalizační sekvencí, která je k proteinu doplněna uměle.

Přestože byly pro dediferenciaci použity různé výchozí buněčné typy, popisují autoři obou strategií přípravy proteinů překvapivě nízkou účinnost v řádu 0,001 % a v porovnání s ostatními metodami výrazně delší čas potřebný k tvorbě kolonií iPCS. (H. Zhou et al. 2009), (Kim et al. 2010)

Další strategie využívající k dediferenciaci proteiny nevyužívá cílené syntézy vybraných proteinů, ale spíše se inspiruje metodou SCNT uvedenou výše. (Cho et al. 2010) Vychází z poznatku, že oocyt, případně ESCs, přirozeně obsahuje ve své cytoplasmě směsici reprogramujících faktorů, které dokáží přivést jádro diferencované buňky do pluripotentního stavu. Oproti předchozím dvěma metodám není tedy nutná genově inženýrská konstrukce expresních systémů, ale stačí pouze pomocí centrifugace vypurifikovat směs proteinů přítomných v cytoplasmě kmenových buněk a následně ošetřit touto směsí proteinů permeabilizované diferencované buňky. Permeabilizace lze dosáhnout například pomocí streptolysinu O. Účinnost tohoto přístupu je srovnatelná s předchozími dvěma proteinovými postupy, ale výrazně se liší rychlost reprogramování. Kolonie iPCS se objevily již v prvním týdnu po dodání proteinů.

2.3.5 Malé molekuly

Od publikování původního Yamanakova experimentu byla nasyntetizována a otestována celá řada malých molekul s cílem nahradit jimi všechny reprogramující faktory a namíchat z nich takovou směs, která by bezpečně a dostatečně účinně dokázala reprogramovat diferencované buňky do pluripotentního stavu nebo s jejich pomocí reprogramování urychlit. (Higuchi et al. 2014) Hlavním cílem působení těchto molekul nejčastěji působících jako inhibitory jsou převážně signální dráhy a dráhy ovlivňující epigenetickou remodelaci chromatinu. V níže uvedené tabulce uvádím některé z těchto molekul a jejich funkci při reprogramování (viz Tabulka 1).

Dediferenciace somatických buněk, konkrétně MEF, pouze s pomocí malých molekul se podařila až v roce 2013, kdy byla nalezena trojice sloučenin schopná nahradit poslední faktor Oct4. (Hou et al. 2013) Kombinace molekul nahrazující zbylé faktory a umožňující tak dediferenciaci pouze s nutností transdukce Oct4 byla známa už dříve. (Li et al. 2011)

K dediferenciaci MEF a získání pluripotentních buněk, jejichž genová exprese odpovídala expresi iPSCs dediferencovaných pomocí transdukce transkripčních faktorů bylo použito pouze sedm malých molekul, přičemž účinnost dosáhla 0,2 % a celý reprogramující proces trval déle než

měsíc. (Hou et al. 2013) Jedná se o kombinaci molekul označovanou jako VC6TFZ v kombinaci s molekulou TTNPB.

Lidské iPSCs dediferencované pouze pomocí malých molekul zatím připraveny nebyly. (Lin and Wu 2015)

Příklady molekul zlepšujících reprogramování			
Název molekuly, v závorce zkratka	Mechanismus účinku	Reference	
Valproová kyselina (VPA)	inhibice histon deacetylázy	(Li et al. 2011)	
5-azacytidin (AZA)	inhibice DNA methyltransferázy	(Mikkelsen et al. 2008)	
Butyrát sodný	inhibice DNA methyltransferázy	(Mali et al. 2010)	
CHIR99021 (CHIR)	inhibice GSK-3β aktivujícího Wnt signální dráhu	(Li et al. 2011)	
Chlorid litný	inhibice GSK-3β a lysin specifické demetylázy	(Q. Wang et al. 2011)	
Příklady molekul nahrazujících reprogramující faktory			
Molekula nebo jejich kombinace	Mechanismus účinku	Nahrazený faktor	Reference
E-616452	inhibice TGF-β vedoucí k transkripci faktoru Nanog	Sox2	(Ichida et al. 2009)
Kenpaullon	neznámý	Klf4	(Lyssiotis et al. 2009)
CHIR VPA	viz výše viz výše	c-Myc	(Li et al. 2011)
Forskolin (FSK) 2-methyl-5-hydroxytryptamin (2Me-5HT) D4475	agonista cAMP agonista 5-HT ₃ , otevírajícího iontový kanál CK1 inhibitor	Oct4	(Hou et al. 2013)

Tabulka 1 Tabulka vybraných molekul, které mají vliv na reprogramování a mechanismus jejich účinku.

V současnosti, 10 let od původního Yamanakova experimentu, je na trhu komerčně dostupná celá řada souprav na přípravu iPSCs založených na jednom z výše popsanych principů. Je však obtížné jednoznačně určit, která ze současných metod je nejlepší. Při výběru metody je třeba mimo finanční náročnosti zohlednit hlavně obtížnost přípravy reprogramujících agens, jejich dopravení do buněk a odstranění z nich, možnosti regulace exprese, účinnost a rychlost reprogramování, které mají vliv na potenciál využití připravených iPSCs v laboratorní a klinické praxi.

Pro laboratorní výzkum vlastností iPSCs bych zvolila lentivirový vektor. Jeho nevýhodou je nutnost separátní přípravy infekční částice, naopak za hlavní výhodu považuji to, že je pro úplné reprogramování dostačující jedna integrace do genomu a zároveň nedochází k jeho vyředování z kultury a tudíž není nutná opakovaná infekce. V porovnání s ostatními metodami má relativně vysokou účinnost. Možnost tvorby inducibilního systému navíc umožňuje sledovat kinetiku dediferenciace. Insert lze také z buněk snadno odstranit.

I když k využití iPSCs v regenerativní medicíně pravděpodobně v nejbližší budoucnosti nedojde, považuji pro tento účel ze současných možností nevhodnější využití mRNA, jelikož zde nehrozí riziko inserce vektoru do genomu a zároveň je to velice rychlá a účinná metoda. Příprava vektoru

zahrnující krok *in vitro* transkripce je sice náročnější než v případě ostatních metod, ale předpokládám, že je možné ji optimalizovat.

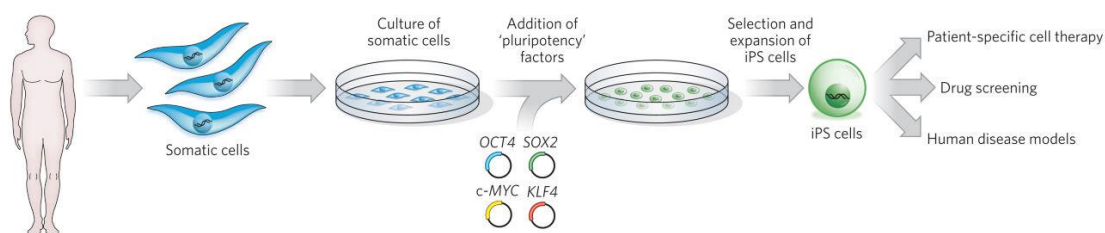
I když lidské somatické buňky zatím pomocí malých molekul reprogramované nebyly, domnívám se, že se to brzy podaří a následně budou k dispozici zoptimalizované protokoly umožňující rychlou, kvalitní a bezpečnou dediferenciaci lidských snadno dostupných buněk pomocí standardizované směsi malých molekul a tato směs bude pak rutinně využíván v klinické praxi.

3 Možnosti využití iPSCs při léčbě hematologických poruch

Možnost odebrat ze zvířecích modelů nebo přímo z pacientů malé množství snadno dostupných buněk, například fibroblastů či krevních buněk, následně je reprogramovat, neomezeně množit a diferencovat v požadovaný buněčný typ představuje neocenitelný nástroj pro výzkum a léčbu geneticky podmíněných chorob a chorob způsobených mutací vzniklou během života jedince. (Blau, Chiu, and Webster 1983)

Takto připravené buňky pocházející z pacienta a nesoucí původní genotyp choroby mohou sloužit pro výzkum molekulárních mechanismů vedoucích k jejímu projevu a hledání látek, které by dokázaly projevy choroby potlačit a zároveň nebyly pro organismus toxické. Dalším variantou využití tohoto postupu je odebrání buněk pacienta, jejich reprogramování, korekce genetické informace, diferenciaci do požadovaného buněčného typu a transplantace do těla pacienta (viz Obrázek 5). Podle typu defektu lze buď poškozený gen opravit pomocí homologní rekombinace, nebo do bezpečného místa (safe harbor) vložit nový funkční gen. (Dong, Rivella, and Breda 2013) Při využití tohoto léčebného postupu nebude již nutné čekat na vhodné dárce a zároveň se eliminuje riziko odmítnutí transplantátu.

V následující části své práce představím čtyři vybrané poruchy krve tvorby a experimenty využívající iPSCs technologii k modelování *in vitro* těchto chorob a eliminace jejich projevů na buněčné úrovni.



Obrázek 5: Znáznornění postupu při využití iPSCs. Z pacienta trpícího geneticky podmíněnou chorobou se odeberou buňky, které se pomocí Yamanakových faktorů reprogramují na iPSCs a následně diferencují na požadovaný buněčný typ. Diferencované buňky pak mohou být použity pro transplantace, výzkum molekulárních mechanismů choroby a testování nových léčiv. (Yamanaka and Blau 2010)

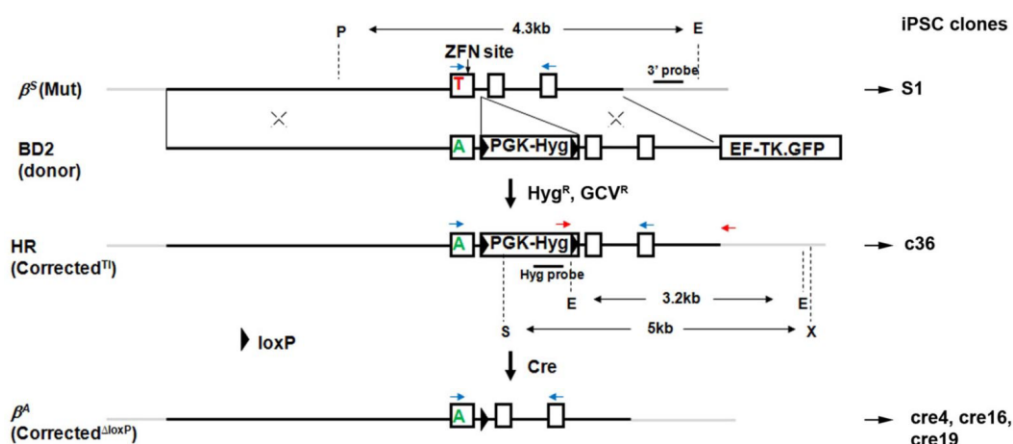
3.1 Srpkovitá anémie (SCD, sickle cell disease)

Srpkovitá anémie je jedním z nejrozšířenějších geneticky podmíněných autozomálně recesivních onemocnění. Její příčina je známa déle než půl století. (Ingram 1956) Příčinou SCD je bodová missense mutace v genu pro řetězec β -globinu. Jedná se o záměnu A \rightarrow T v šestém kodonu prvního

exonu, jež se na proteinové úrovni projevuje záměnou hydrofilní kyseliny glutamové za hydrofobní valin. Přítomnost hydrofobního valinu vede k řetězení globinových tetrametrů ($\alpha_2\beta_2$) do lineárních polymerů, které způsobují změnu tvaru erytrocytů z bikonkávních na srpkovité. Patologický srpkovitý tvar znemožňuje červeným krvinkám průchod kapilárami. Krvinky ucpávají krevní řečiště a lyzují v něm. Uvolněný hemoglobin je navíc toxický pro okolní tkáň. Jelikož příčinou SCD je pouze jedna konkrétní známá bodová mutace, představuje toto onemocnění ideální model pro výzkum aplikace iPSCs v regenerativní medicíně.

První pokus o léčbu SCD za využití iPSCs byl publikován v roce 2007. (Hanna et al. 2007) V experimentu byla použita myš, která měla geny pro myši α a β -globin nahrazeny lidskými analogy, přičemž obě alely genu pro β -globin byly mutantní β^S . Tento myši model byl životaschopný, ale projevil se u něj příznaky srpkovité anémie podobné těm u člověka. Myši byly ze špičky ocasu odebrány fibroblasty (TTF, tail tip fibroblast), které byly reprogramovány pomocí virových vektorů. Následně byl do získaných iPSCs vnesen genový konstrukt, který pomocí homologní rekombinace nahradil mutovanou β^S alelu za alelu nemutovanou β^A . Buňky, ve kterých došlo k rekombinaci, byly následně diferencovány v hematopoetické kmenové buňky (HSCs, hematopoietic stem cells) a transplantovány do β^S myši, kterým byly předem pomocí ozáření odstraněny původní HSCs kostní dřeně. Transplantace hematopoetických buněk s opraveným genem pro β -globin vedla k potlačení příznaků anémie u léčených myši. Tento experiment byl prvním důkazem, že lze cíleně upravit pomocí homologní rekombinace genetickou informaci v iPSCs a následně je diferencovat a poté použít k transplantaci.

V návaznosti na tento experiment byly pomocí homologní rekombinace a technologie nukleáz se zinkovými prsty (ZFN, zinc finger nuclease) opraveny i β^S alely v lidských iPSCs (viz Obrázek 6). (Zou, Mali, et al. 2011), (Sebastiano and Maeder 2011) ZFN jsou uměle zkonstruované enzymy obsahující jednu endonukleázovou doménu a tři DNA-vazebné domény, které lze nadesignovat dle cílové sekvence. Dvojice ZFN navodí v požadovaném místě dsDNA zlom, který zvýší pravděpodobnost homologní rekombinace s opravnou sekvencí. Součástí opravné sekvence může být rezistenční kazeta, která je vložena do intronu vkládaného genu ohraničená loxP místy. Slouží k selekci buněk, ve kterých došlo k rekombinaci. Následná transientní exprese Cre rekombinázy selekční kazetu odstraní. Výsledkem je opravený gen, který nese v intronu krátkou sekvenci, která zbyla po odstranění rezistenční kazety Cre rekombinázou. Před dalším použitím opravených buněk je však nutné prověřit, zda nedošlo ke štěpení pomocí ZFN nukleáz na jiných místech v genomu.



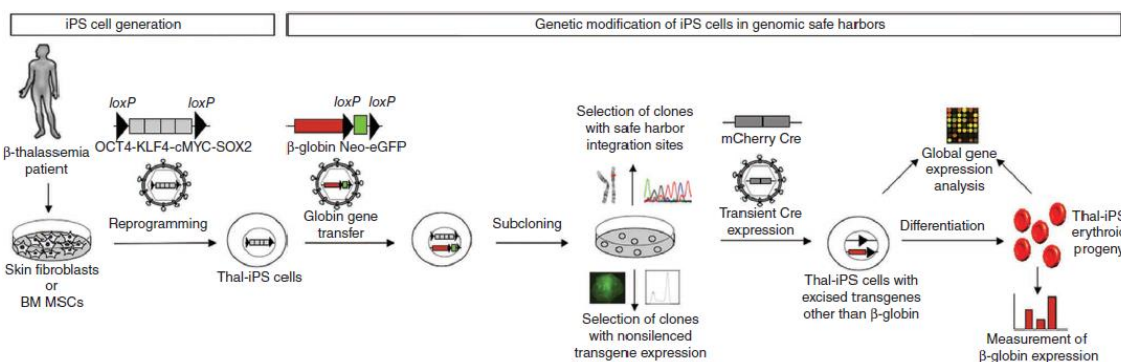
Obrázek 6: Znáznornění postupu při opravě bodové mutace v genu pro β -globin za využití homologní rekombinace a technologie ZFN. Součástí opravné sekvence DNA je i rezistenční kazeta, kterou lze využít pro selekci buněk, ve kterých došlo k rekombinaci, a následně ji lze odstranit pomocí Cre rekombinázy. (Zou, Mali, et al. 2011)

3.2 β -talasemie

Jako β -talasemie souhrnně označujeme geneticky podmíněná onemocnění, jejichž příčinou jsou mutace v genu pro β -globin vedoucí k poruše jeho syntézy. (Dong, Rivella, and Breda 2013) Výsledkem je tvorba nefunkčního či částečně funkčního β -globinu nebo se β -globin vůbec netvoří. Dnes je jediná dostupná léčba krevní transfuze v kombinaci s chelatací volného železa, tento postup však pouze tlumí příznaky, ale neodstraňuje příčinu choroby. Jedinou možností, jak β -talasemii odstranit, je tedy oprava mutovaného genu pro β -globin, podobně jako u SCD, nebo vložit do bezpečného místa v genomu nový funkční gen pro β -globin. Druhou možností, vložení terapeutického genu, nelze v případě SCD použít, jelikož vložení genu pro β -globin navíc by vedlo k celkové nadprodukci

β -globinu, terapeutického a mutantního, a jeho nevhodnému poměru vůči α -globinu v erytrocytu. Tento efekt by se projevil jako α -talasemie, nedostatek α -globinu. (Dong, Rivella, and Breda 2013) Naopak v případě takového typu β -talasemie, kdy se v buňce žádný β -globin netvoří, tento postup použít lze.

Příkladem je β -talasemie major, také zvaná Cooleyho anémie. U pacientů trpících tímto typem talasemie jsou mutovány obě alely genu pro β -globin. Do iPSCs připravených z jejich buněk lze pomocí lentivirového vektoru vnést gen kódující funkční β -globin a tím potlačit projev β -talasemie (viz Obrázek 7). (Papapetrou et al. 2011) Nevýhodou je, tak jako u všech postupů využívajících lentivirový vektor, náhodnost jeho integrace, která může mít vliv na expresi okolních genů. Pomocí microarrays však bylo zjištěno, že lentivirový insert nesoucí funkční gen pro β -globin neovlivní expresi sousedního genu, je-li od něj vzdálen více než 300 kbp. Na druhou stranu je výhodou, že použití univerzálního lentivirového vektoru může usnadnit léčbu pacientů trpících tímto onemocněním, jelikož by bylo možné použít jeden typ vektoru pro všechny pacienty trpící β -talasemií major bez ohledu na typ mutace v jejich genech pro β -globin. Před použitím tohoto terapeutického postupu by ale bylo nutné nejdříve sestavit seznam bezpečných míst v genomu, která jsou vhodná pro inserci terapeutického vektoru.



Obrázek 7: Postup při léčbě pacienta trpícího β -talasemií. Do iPSCs připravených z jeho buněk je pomocí integrativního virového vektoru vložen terapeutický gen pro β -globin. Následně jsou vybrány buňky, které byly úspěšně transdukovány a vektor byl vložen do bezpečného místa. Tyto buňky jsou pak diferencovány a sleduje se jejich transkripční profil. (Papapetrou et al. 2011)

Pro opravu β -globinového genu, aniž by došlo k inserci nové sekvence do genomu lze využít i metody umožňující genové reparace. Kromě klasické homologní rekombinace, která má velice nízkou účinnost, (Y. Wang et al. 2012) lze použít i CRISPR/Cas9 systém. (Y. Yang et al. 2016) CRISPR/Cas9 systém slouží podobně jako technologie ZFN popsaná výše k tvorbě místně specifických dsDNA zlomů. K tvorbě zlomu v konkrétním místě slouží sgRNA (small guide RNA), která je komplementární k cílové DNA sekvenci, která má být rozštěpena a která asociuje s Cas9 endonukleázou, jež sekvenci rozštěpí. Následně dojde k reparaci DNA zlomu pomocí homologní rekombinace s terapeutickým insertem vloženým do buňky, podobně jako v případě SCD.

3.3 X-vázaná chronická granulomatózní choroba (X-CGD, X-linked chronic granulomatous disease)

Toto onemocnění, na rozdíl od předchozích, není spojeno s poruchou tvorby hemoglobinu, ale souvisí s imunitním systémem. Konkrétně s poruchou funkce fagocytujících leukocytů. (Zou, Sweeney, et al. 2011) Jeho příčinou je nefunkčnost genu CYBB kódujícího protein gp91^{phox}, který je umístěn na X chromozomu, jedná se tedy o gonosomálně recesivní dědičnost choroby. Příčinou nefunkčnosti CYBB genu může být celá řada mutací. Protein gp91^{phox} je součástí NADPH oxidázového komplexu, který přenáší z redukované molekuly NADPH elektron na molekulu kyslíku za vzniku superoxidového radikálu. Tato reakce je nezbytná pro iniciaci oxidativního vzplanutí, procesu sloužícího k likvidaci fagocytovaných patogenů, bakterií a hub, ve fagosomech pomocí kyslíkových radikálů. Pacienti trpící X-CGD tak nejsou schopni se účinně bránit infekcím patogenů ohrožujícím jejich tělo. Jediný dostupný způsob léčby je transplantace kostní dřeně od vhodných dárců.

Z jedinců trpících X-CGD lze izolovat fibroblasty, reprogramovat je na iPSCs, následně diferencovat na myeloidní prekursor a vložit do nich terapeutický lentivirový vektor nesoucí funkční gen pro gp91^{phox}. (Mukherjee et al. 2011) Myeloidní prekursor je možné následně testovat pomocí testu využívajícího nitrotetrazoliovou modř (NBT, nitroblue tetrazolium) na přítomnost funkčního NADPH oxidázového komplexu. Vlivem redukujícího prostředí, které vzniká činností NADPH oxidázového komplexu, změní NBT svoji strukturu a zbarví se do tmavě modra.

Tmavomodré zabarvení tak umožňuje indikovat přítomnost funkční NADPH oxidázy a tak i úspěšnou integraci a funkčnost vektoru.

V experimentu provedeném na myším modelu bylo zjištěno, že transdukce fibroblastů lentivirovým vektorem před reprogramováním má třikrát menší účinnost obnovení funkce NADPH oxidázového komplexu než transdukce vzniklých EB. Příčinou je vysoká úroveň methylace CpG ostrovů promotoru vloženého terapeutického genu, ke které došlo v důsledku reprogramování a diferenciace buněk po transdukci. (Mukherjee et al. 2011)

Při vnášení terapeutického plasmidu obsahujícího gp91^{phox} do lidských iPSCs se podařilo za využití ZFN technologie umístit cíleně do bezpečného místa v genomu konstrukt, který kromě CYBB genu obsahoval i gen pro puromycinovou rezistenci pro selekci buněk, ve kterých došlo k jeho integraci. (Zou, Sweeney, et al. 2011) Tato metoda dosáhla vysoké účinnosti, 75 % buněk obsahovalo aspoň jeden integrovaný vektor. Následně bylo potvrzeno, že v buňkách obsahujících jednu inserci dochází dlouhodobě k expresi endogenního proteinu gp91^{phox} a funkce NADPH oxidázového komplexu byla obnovena.

3.4 Pravá polycytémie (PV, Polycythemia vera)

Pravá polycytémie patří mezi myeloproliferativní poruchy (MPNs, Myeloproliferative neoplasms), což je skupina onemocnění projevujících se zvýšenou produkcí jednoho nebo více krevních elementů myeloidní řady. (Slukvin 2009) Mezi MPNs patří kromě PV například i esenciální trombocytémie a chronická myeloidní leukemie. 95 % pacientů trpících PV nese získanou substituční bodovou mutaci v genu pro Janusovu kinázu 2 (JAK2, Janus kinase 2) vedoucí k záměně aminokyseliny valinu za fenylalanin na pozici 617, JAK2-V617F. Stejnou mutaci nese i 50 % pacientů trpících esenciální trombocytémií. Stále však není jednoznačně potvrzeno, zda je tato mutace jedinou příčinou nemoci, nebo zda jejímu vzniku předchází přítomnost jiné mutace v genech, které zatím nejsou s PV spojovány, či nejsou známy. Druhá možnost se ale ukazuje jako pravděpodobnější. (Kralovics et al. 2006) Zisková mutace (gain-of-function mutation) JAK2-V617F způsobuje trvalou aktivaci kinázy, která je za normálních podmínek aktivovaná signalizací erythropoetinem. To vede ke zvýšené erytropoéze, což se u pacientů projevuje velmi viskózní krví, která špatně proudí krevním řečištěm a k následným trombotickým komplikacím.

Jelikož mutace JAK2-V617F může vzniknout během života pacienta, lze tak mezi jeho krvetvornými buňkami nalézt směs buněk nesoucích jednu nebo obě mutované alely i zdravé buňky s oběma nemutovanými alelami, případně buňky, které nesou zatím neznámou predisponující mutaci. Z CD34+ krevních buněk jednoho PV pacienta tak lze derivovat iPSC nesoucí různý genotyp: homozygotní i heterozygotní V617F linie, linie s predispozicí a normální kontrolní linie. iPSCs nesoucí JAK2-V617F mutaci lze následně diferencovat na hematopoetické progenitorové buňky, které rekapitulují polycytemický fenotyp *in vitro*. Oproti negativní kontrole vykazují zvýšenou erytropoézu, kterou lze detekovat například pomocí povrchového proteinu glykoporinu A přítomného na erytrocytech. (Ye et al. 2014) Zatím bohužel nebyla publikována žádná studie, která by odhalila pomocí iPSCs technologie novou mutaci, případně mutace, které předchází získání mutace V617F. (Ye et al. 2014)

Snížení erytropoézy lze dosáhnout inhibicí signalizace JAK2 některým z jejích inhibitorů. (Ye et al. 2014) Účinnost inhibitorů JAK2 v různých koncentracích byla testována *in vitro* přímo na hematopoetických progenitorových buňkách derivovaných z iPSCs. Již při derivaci hematopoetických progenitorových buněk z iPSCs byla pozorována intenzivnější diferenciaci v myeloidní prekursor v případě iPSCs nesoucích JAK2-V617F mutaci v porovnání s negativními kontrolami bez mutace, což potvrzuje poznatek, že tato mutace má na zvýšení erytropoézy vliv. Při testování vlivu tří vybraných inhibitorů JAK2 INCB018424, TG101348 a CYT387, bylo zjištěno, že v případě prvních dvou dojde k úplnému zastavení a v případě třetího ke zpomalení buněčné proliferace a erytroidní diferenciaci při koncentraci 250 nM v podmínkách stimulujících erytropoézu bez ohledu na přítomnost JAK2-V617F mutace. (Ye et al. 2014)

Uvedené experimenty ukazují, že současná klinicky používaná generace JAK2 inhibitorů nedokáže selektivně zablokovat mutantní JAK2 kinázu, ale iPSC linie derivované z buněk pacientů, jsou vhodným modelem pro další testování těchto léků.

Na předchozích vybraných příkladech geneticky podmíněných poruch krvetvorby jsem uvedla, že je možné z pacienta odebrat buňky, získat z nich iPSCs, opravit v nich pomocí různých metod mutantní gen a diferencovat je do požadovaného buněčného typu nebo mutaci neopravit a po diferenciaci sledovat její projevy na buněčné úrovni *in vitro*. I když jsou v současnosti známy protokoly umožňující rekapitulaci hematopoézy a umožňující tak diferenciaci hematopoetických prekursorů *in vitro* (Choi et al. 2012), (Kennedy et al. 2012), je v současné době z těchto kroků nejvíce limitující krok diferenciaci lidských iPSCs na multipotentní HSCs, které by bylo možno neomezeně množit *ex vivo*. Takovéto buňky stále zůstávají „svatým grálem“ současného hematologického výzkumu. (Singbrant et al. 2015) Nalezení spolehlivého způsobu jak tyto buňky získat je klíčové nejen pro výzkum, ale hlavně pro regenerativní medicínu, proto se na závěr své práce shrnu nejnovější poznatky v této oblasti.

Již v roce 2002 bylo zjištěno, že myší HSCs, které mají schopnost zcela nahradit odstraněnou myší kostní dřeň, lze získat transienční expresí pouze jednoho homeotického genu HoxB4 v buňkách odvozených z myších EB. (Kyba, Perlingeiro, and Daley 2001) Následně se však ukázalo, že exprese pouze tohoto genu je nedostačující pro diferenciaci lidských embryonálních kmenových buněk na HSCs, a proto je třeba hledat jiné způsoby, které by umožnily lidské HSCs reprogramovat ze somatických buněk.

První strategie je strategie inspirovaná reprogramováním iPSCs. (Riddell et al. 2014) Autoři transdukovali pomocí lentivirových vektorů myší krevní buňky 36 vybranými geny, jejichž exprese je charakteristická pro HSCs. Takto se jim podařilo získat HSCs, které byly schopné nahradit původní buňky kostní dřeně. Jelikož ne všechny buňky obsahovaly všech 36 faktorů, bylo možné následně pomocí PCR analýzy zjistit, které z genů dopravených na lentivirovém vektoru jsou v získaných HSCs nejvíce zastoupeny, a tudíž pro jejich derivaci nezbytné. Nalezli takto šestici TF Hlf, Runx1t1, Pbx1, Lmo2, Zfp37, a Prdm5, které jsou dostačující pro derivaci myších HSCs schopných nahradit kostní dřeň. Podobně jako Yamanaka, nazvali tyto buňky indukované hematopoetické kmenové buňky (iHSCs, induced hematopoietic stem cells).

Druhá strategie hledá způsob jak získat HSCs diferenciací z ESCs nebo z iPSCs. (Doulatov et al. 2013) Autoři místo myších použili lidské pluripotentní kmenové buňky, které nejprve diferencovali na myeloidní prekursory a následně diferencovali pomocí transdukce vybraných transkripčních faktorů na HSCs. Zjistili, že exogenní exprese trojice transkripčních faktorů HOXA9, ERG a RORA je dostačující k dediferenciaci myeloidních prekursorů na multipotentní HSCs schopné se obnovovat, avšak nebyly dostatečné pro úplné obnovení krvetvorby v myším modelu. Aby došlo aspoň ke krátkodobé produkci krevních buněk *in situ*, bylo nutno v buňkách exprimovat další dva transkripční faktory SOX4 a MYB.

Nevýhodou obou postupů je nutnost umístění transdukovaných buněk přímo do myší kostní dřeně bez možnosti uskutečnit všechny kroky reprogramování *in vitro*, jelikož stále není přesně známé složení mikroprostředí a signální dráhy nutné k průběhu kompletní hematopoézy. (Singbrant et al. 2015) Dokonalá znalost mikroprostředí kostní dřeně, ve kterém může proběhnout komplexní hematopoéza, je nezbytná pro zavedení iPSCs technologie jakožto léčby pacientů trpících geneticky podmíněnou poruchou krvetvorby a zároveň může usnadnit modelování dalších geneticky podmíněných chorob.

4 Závěr

Ve své bakalářské práci jsem popsala revoluční technologii reprogramování buněk do pluripotentního stavu, která v uplynulém desetiletí změnila pohled na definování buněčného osudu a umožnila vědcům relativně snadno, pouze pomocí čtyř transkripčních faktorů, manipulovat epigenetickou informaci diferencovaných somatických buněk. Za předpokladu bezpečného dopravení těchto faktorů do buněk beze změny v genomu, která by mohla vést k poruše regulace buněčného cyklu a následné tumorogenezi, představují takto získané pluripotentní kmenové buňky jedinečný nástroj pro regenerativní medicínu a výzkum. Za bezpečné považuji ty metody, které nezahrnují integraci terapeutického vektoru do genomu cílové buňky jako například využití Sendai virového vektoru, mRNA, proteinů či malých molekul. Nevýhodami všech dosud použitých metod přípravy iPSCs jsou v současnosti hlavně časová náročnost a nízká výtěžnost reprogramování.

Na příkladech geneticky podmíněných poruch krvetvorby jsem popsala nejpoužívanější způsoby jak projevy mutace odstranit. Je-li přesně známo, o jakou mutaci se jedná, je možné pomocí homologní rekombinace nahradit mutované místo opravnou sekvencí. Účinnost homologní rekombinace lze zvýšit pomocí ZFN nebo CRISPR/Cas9 technologií. Takto lze například odstranit mutaci v buňkách pacientů trpících SCD nebo PV způsobenou JAK-V617F mutací. Není-li příčinou nemoci pouze jedna známá mutace, ale více různých mutací v tomtéž genu způsobujících jeho nefunkčnost jako v případě β -talasemií, je výhodnější vložit do bezpečného místa v genomu terapeutický vektor nesoucí funkční gen. To umožní léčit celou skupinu pacientů nesoucích různé mutace v tomtéž genu jednotným postupem bez ohledu na molekulární podstatu jejich mutace. V případě ziskových mutací, které způsobují novou nebo zvýšenou aktivitu genového produktu, jako je mutace JAK-V617F, lze testovat látky, které tuto nežádoucí aktivitu inhibují. V tomto případě je

nutné diferencovat buňky do stavu, ve kterém je mutantní gen přirozeně exprimován a jeho produkt se může projevit.

Diferenciace pluripotentních buněk na plnohodnotné hematopoetické kmenové buňky *in vitro* zatím není možná, i když byla objevena kombinace transkripčních faktorů dostatečná pro dediferenciaci hematopoetických progenitorových buněk získaných z iPSCs na HSCs. Stále neumíme napodobit prostředí kostní dřeně, přirozenou niku HSCs, kde se během života jedince odehrává hematopoéza a které je nezbytné pro správnou funkci HSCs. Proto považuji hledání způsobu jak získat a udržet HSCs *in vitro* za jednu z nejdůležitějších oblastí výzkumu v rámci buněčné terapie v hematologii. Úspěch v této oblasti je klíčový pro zavedení výše shrnutého postupu do klinické praxe.

5 Seznam použitých zkratk

Zkratka	Anglický význam	Český význam
AP	alkaline phosphatase	alkalická fosfatáza
CF	cell fusion	buněčná fúze
ChIP	chromatine immunoprecipitation	imunoprecipitace chromatinu
ESCsC	embryonic stem cells cycle	cyklus embryonálních kmenových buněk
GFP	green fluorescence protein	zelený fluorescenční protein
HSCs	hematopoietic stem cells	hematopoetické kmenové buňky
iHSCs	induced hematopoietic stem cells	indukované hematopoetické kmenové buňky
iPSC	induced pluripotent stem cells	indukované pluripotentní kmenové buňky
IRES	internal ribosome entry site	místo pro vnitřní nasednutí ribosomu
JAK2	Janus kinase 2	Janusova kináza 2
LOS	large offspring syndrome	syndrom velkého potomstva
MEF	mouse embryonic fibroblast	myší embryonální fibroblasty
MPNs	myeloproliferative neoplasms	myeloproliferativní poruchy
NBT	nitroblue tetrazolium	tetrazoliová modř
ntESCs	nuclear transfer embryonic stem cells	embryonální buňky vzniklé přenosem jader
PEG	polyethyleneglycol	polyetyleneglykol
PV	polycythemia vera	pravá polycytémie
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction	polymerázové řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí
SCD	sickle cell disease	srpkovitá anémie
SCNT	somatic cell nuclear transfer	přenos jader tělních buněk
sgRNA	small guide ribonucleotidic acid	malá vodící ribonukleová kyselina
SSEA1	stage specific embryonic antigen 1	stadiově specifický embryonální antigen 1
TTF	tail tip fibroblast	fibroblasty z konce ocasu
X-CGD	X-linked chronic granulomatous disease	X-vázaná chronická granulomatózní choroba
ZFN	zinc finger nuclease	nukleázy se zinkovými prsty

6 Seznam obrázků a tabulek

Obrázek 1: Schematické znázornění funkce genového fúzního systému. [16].....	4
Obrázek 2: Mapa lentivirového vektoru STEMCCA. [30]	8
Obrázek 3: Schematické zobrazení Sendai virového vektoru. [24].....	9
Obrázek 4: Mapa piggyBac transpozonu. [36]	11
Obrázek 5: Znázornění postupu při využití iPSCs. [1].....	15
Obrázek 6: Znázornění postupu při opravě bodové mutace. [53]	17
Obrázek 7: Postup při léčbě pacienta trpícího β -talasemií. [55].....	18
Tabulka 1 Tabulka vybraných molekul.	14

7 Použitá literatura

Reference označené * jsou sekundární zdroje a review

- Blau, Helen M., Choy Pik Chiu, and Cecelia Webster. 1983. "Cytoplasmic Activation of Human Nuclear Genes in Stable Heterocaryons." *Cell* 32 (4): 1171–80. doi:10.1016/0092-8674(83)90300-8.
- Brambrink, Tobias, Ruth Foreman, G Grant Welstead, Christopher J Lengner, Marius Wernig, and Heikyun Suh. 2008. "Sequential Expression of Pluripotency Markers during Direct Reprogramming of Mouse Somatic Cells." *Cell Stem Cell* 2 (2): 151–59. doi:10.1016/j.stem.2008.01.004.
- Briggs, R, and T J King. 1952. "Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 38 (5): 455–63. doi:10.1073/pnas.38.5.455.
- Carey, Bryce W, Styliani Markoulaki, Jacob Hanna, Kris Saha, Qing Gao, Maisam Mitalipova, and Rudolf Jaenisch. 2009. "Reprogramming of Murine and Human Somatic Cells Using a Single Polycistronic Vector." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (1): 157–62. doi:10.1073/pnas.0811426106.
- Chang, Chia-Wei, Yi-Shin Lai, Kevin M Pawlik, Kaimao Liu, Chiao-Wang Sun, Chao Li, Trenton R Schoeb, and Tim M Townes. 2009. "Polycistronic Lentiviral Vector for 'Hit and Run' Reprogramming of Adult Skin Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells." *STEM CELLS* 27 (5). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: 1042–49. doi:10.1002/stem.39.
- Cho, Hyun-jai, Choon-soo Lee, Yoo-wook Kwon, Jae Seung Paek, Sun-hee Lee, Jin Hur, Eun Ju, et al. 2010. "Protein-Based Reprogramming without Genetic Manipulation Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Somatic Cells by Protein-Based Reprogramming without Genetic Manipulation" 116 (3): 386–95. doi:10.1182/blood-2010-02-269589.
- Choi, Kyung Dal, Maxim A. Vodyanik, Padma Priya Togarrati, Kran Suknutha, Akhilesh Kumar, Fnu Samarjeet, Mitchell D. Probasco, et al. 2012. "Identification of the Hemogenic Endothelial Progenitor and Its Direct Precursor in Human Pluripotent Stem Cell Differentiation Cultures." *Cell Reports* 2 (3). The Authors: 553–67. doi:10.1016/j.celrep.2012.08.002.
- Dong, Alisa, Stefano Rivella, and Laura Breda. 2013. "Gene Therapy for Hemoglobinopathies: Progress and Challenges." *Translational Research* 161 (4): 293–306. doi:10.1016/j.trsl.2012.12.011.*
- Doulatov, Sergei, Linda T. Vo, Stephanie S. Chou, Peter G. Kim, Natasha Arora, Hu Li, Brandon K. Hadland, et al. 2013. "Induction of Multipotential Hematopoietic Progenitors from Human Pluripotent Stem Cells via Respecification of Lineage-Restricted Precursors." *Cell Stem Cell* 13 (4): 459–70. doi:10.1016/j.stem.2013.09.002.
- Elsdale, T R, J B Gurdon, and M Fischberg. 1960. "A Description of the Technique for Nuclear Transplantation in *Xenopus laevis*." *Development (Cambridge, England)* 8 (4): 437–44. <http://dev.biologists.org/content/8/4/437.abstract> npapers3://publication/uuid/34D23BC3-4103-4A83-BDA7-87CD657652E9.
- Fusaki, Noemi, Hiroshi Ban, Akiyo Nishiyama, Koichi Saeki, and Mamoru Hasegawa. 2009. "Efficient Induction of Transgene-Free Human Pluripotent Stem Cells Using a Vector Based on Sendai Virus, an RNA Virus That Does Not Integrate into the Host Genome." *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences* 85 (8): 348–62. doi:10.2183/pjab.85.348.
- Hanna, J., M. Wernig, S. Markoulaki, C.-W. Sun, A. Meissner, J. P. Cassady, C. Beard, et al. 2007. "Treatment of Sickle Cell Anemia Mouse Model with iPS Cells Generated from Autologous Skin." *Science* 318 (5858): 1920–23. doi:10.1126/science.1152092.
- Higuchi, Akon, Qing-Dong Ling, S Suresh Kumar, Murugan a Munusamy, Abdullah a Alarfaj, Yung Chang, Shih-Hsuan Kao, Ke-Chen Lin, Han-Chow Wang, and Akihiro Umezawa. 2014. "Generation of Pluripotent Stem Cells without the Use of Genetic Material." *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 00 (300). Nature Publishing Group: 1–17. doi:10.1038/labinvest.2014.132.*
- Hou, P, Y Li, X Zhang, C Liu, J Guan, H Li, T Zhao, et al. 2013. "Pluripotent Stem Cells Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds." *Science* 341 (6146): 651–54. doi:10.1126/science.1239278.
- Ichida, Justin K, Joel Blanchard, Kelvin Lam, Esther Y Son, Julia E Chung, Dieter Egli, Kyle M Loh, et al. 2009. "A Small-Molecule Inhibitor of Tgf- β Signaling Replaces Sox2 in Reprogramming by Inducing Nanog." *Cell Stem Cell* 5 (5): 491–503. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2009.09.012.
- Ingram, V M. 1956. "A Specific Chemical Difference between the Globins of Normal Human and Sickle-Cell Anaemia Haemoglobin." *Nature* 178 (4537): 792–94. doi:10.1038/178792a0.

- Jia, Fangjun, Kitchener D Wilson, Ning Sun, Deepak M Gupta, Mei Huang, Zongjin Li, Robert C Robbins, Mark A Kay, Michael T Longaker, and Joseph C Wu. 2010. "A Nonviral Minicircle Vector for Deriving Human iPS Cells." *Nature Methods* 7 (3): 197–99. doi:10.1038/nmeth.1426.
- Judson, Robert L, Joshua E Babiarz, Monica Venere, and Robert Blelloch. 2009. "Embryonic Stem Cell-Specific microRNAs Promote Induced Pluripotency." *Nat Biotech* 27 (5). Nature Publishing Group: 459–61.
- Kennedy, Marion, Geneve Awong, Christopher M. Sturgeon, Andrea Ditadi, Ross LaMotte-Mohs, Juan Carlos Zúniga Pflücker, and Gordon Keller. 2012. "T Lymphocyte Potential Marks the Emergence of Definitive Hematopoietic Progenitors in Human Pluripotent Stem Cell Differentiation Cultures." *Cell Reports* 2 (6): 1722–35. doi:10.1016/j.celrep.2012.11.003.
- Kim, D, C-H Kim, J-I Moon, Y-G Chung, M-Y Chang, B-S Han, S Ko, et al. 2010. "Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins." *Cell Stem Cell* 4 (6): 472–76. doi:10.1016/j.stem.2009.05.005.Generation.
- Kralovics, Robert, Robert Kralovics, Soon-siong Teo, Sai Li, Sai Li, Alexandre Theocharides, et al. 2006. "Acquisition of the V617F Mutation of JAK2 Is a Late Genetic Event in a Subset of Patients with Myeloproliferative Disorders." *Cancer* 108 (4): 1377–80. doi:10.1182/blood-2005-11-009605.Supported.
- Kyba, M, R C R Perlengiero, and G Q Daley. 2001. "HoxB4 Confers Definitive Lymphoid-Myeloid Engraftment Potential on Embryonic Stem Cell and Yolk Sac Hematopoietic Progenitors." *Cell* 109: 29–37. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867402006803papers://e4e91285-7e3b-4e20-9d75-546bc15a52f8/Paper/p352>.
- Li, Yanqin, Qiang Zhang, Xiaolei Yin, Weifeng Yang, Yuanyuan Du, Pingping Hou, Jian Ge, et al. 2011. "Generation of iPSCs from Mouse Fibroblasts with a Single Gene, Oct4, and Small Molecules." *Cell Research* 21 (1). Nature Publishing Group: 196–204. doi:10.1038/cr.2010.142.
- Lin, Tongxiang, and Shouhai Wu. 2015. "Reprogramming with Small Molecules instead of Exogenous Transcription Factors." *Stem Cells International* 2015. doi:10.1155/2015/794632.*
- Lyssiotis, Costas A, Ruth K Foreman, Judith Staerk, Michael Garcia, Divya Mathur, Styliani Markoulaki, Jacob Hanna, et al. 2009. "Reprogramming of Murine Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells with Chemical Complementation of Klf4." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (22): 8912–17. doi:10.1073/pnas.0903860106.
- Maherali, Nimet, and Konrad Hochedlinger. 2008. "Protocol Review Guidelines and Techniques for the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells." *Stem Cell* 3 (6). Elsevier Inc.: 595–605. doi:10.1016/j.stem.2008.11.008.*
- Maherali, Nimet, Rupa Sridharan, Wei Xie, Jochen Utikal, Sarah Eminli, Katrin Arnold, Matthias Stadtfeld, et al. 2007. "Directly Reprogrammed Fibroblasts Show Global Epigenetic Remodeling and Widespread Tissue Contribution." *Cell Stem Cell* 1 (1): 55–70. doi:10.1016/j.stem.2007.05.014.
- Mali, Prashant, Bin-Kuan Chou, Jonathan Yen, Zhaohui Ye, Jizhong Zou, Sarah Dowey, Robert A Brodsky, et al. 2010. "Butyrate Greatly Enhances Derivation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Promoting Epigenetic Remodeling and the Expression of Pluripotency-Associated Genes." *STEM CELLS* 28 (4). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: 713–20. doi:10.1002/stem.402.
- Matthias Stadtfeld, Masaki Nagaya, Jochen Utikal, Gordon Weir, and Konrad Hochedlinger. 2014. "Induced Pluripotent Stem Cells Generated without Viral Integration." *Science* 322 (5903): 945–49. doi:10.1126/science.1162494.Induced.
- Mikkelsen, T S, J Hanna, X Zhang, M Ku, M Wernig, P Schorderet, B E Bernstein, R Jaenisch, E S Lander, and A Meissner. 2008. "Dissecting Direct Reprogramming through Integrative Genomic Analysis." *Nature* 454 (7200): 49–55. doi:10.1038/nature07056.
- Minal Patel & Shuying Yang. 2011. "Advances in Reprogramming Somatic Cells to Induced Pluripotent Stem Cells." *Stem Cell Rev.* 6 (3): 367–80. doi:10.1007/s12015-010-9123-8.Advances.*
- Morris, Samantha A, and George Q Daley. 2013. "A Blueprint for Engineering Cell Fate: Current Technologies to Reprogram Cell Identity." *Cell Research* 23 (1). Nature Publishing Group: 33–48. doi:10.1038/cr.2013.1.*
- Mukherjee, Sayandip, Giorgia Santilli, Michael P. Blundell, Susana Navarro, Juan A. Bueren, and Adrian J. Thrasher. 2011. "Generation of Functional Neutrophils from a Mouse Model of X-Linked Chronic Granulomatous Disorder Using Induced Pluripotent Stem Cells." *PLoS ONE* 6 (3): 1–10. doi:10.1371/journal.pone.0017565.
- Okita, Keisuke, Tomoko Ichisaka, and Shinya Yamanaka. 2007. "Generation of Germline-Competent Induced Pluripotent Stem Cells." *Nature* 448 (7151): 313–17. doi:10.1038/nature05934.
- Okita, Keisuke, Masato Nakagawa, Hong Hyenjong, Tomoko Ichisaka, and Shinya Yamanaka. 2008. "Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors." *Science* 322 (5903):

- Papapetrou, Eirini P, Gabsang Lee, Nirav Malani, Manu Setty, Isabelle Riviere, Laxmi M S Tirunagari, Kyuichi Kadota, et al. 2011. “Genomic Safe Harbors Permit High β -Globin Transgene Expression in Thalassemia Induced Pluripotent Stem Cells.” *Nature Biotechnology* 29 (1): 73–78. doi:10.1038/nbt.1717.
- Riddell, Jonah, Roi Gazit, Brian S. Garrison, Guoji Guo, Assieh Saadatpour, Pankaj K. Mandal, Wataru Ebina, et al. 2014. “Reprogramming Committed Murine Blood Cells to Induced Hematopoietic Stem Cells with Defined Factors.” *Cell* 157 (3). Elsevier Inc.: 549–64. doi:10.1016/j.cell.2014.04.006.
- Ringertz, N R, S a Carlsson, T Ege, and L Bolund. 1971. “Detection of Human and Chick Nuclear Antigens in Nuclei of Chick Erythrocytes during Reactivation in Heterokaryons with HeLa Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68 (12): 3228–32. doi:10.1073/pnas.68.12.3228.
- Sebastiano, Vittorio, and ML Maeder. 2011. “In Situ Genetic Correction of the Sickle Cell Anemia Mutation in Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Engineered Zinc Finger Nucleases.” *Stem ...* 29 (11): 1717–26. doi:10.1002/stem.718.In.
- Singbrant, Sofie, Peter van Galen, Daniel Lucas, Grant Challen, Derrick J. Rossi, and George Q. Daley. 2015. “Two New Routes to Make Blood: Hematopoietic Specification from Pluripotent Cell Lines versus Reprogramming of Somatic Cells.” *Experimental Hematology* 43 (9). ISEH - International Society for Experimental Hematology: 756–59. doi:10.1016/j.exphem.2015.05.007.*
- Slukvin, Igor I. 2009. “Neoplastic Blood Cells Become Pluripotent.” *Blood* 114 (27): 5409–10.*
- Sommer, Cesar a, Matthias Stadtfeld, George J Murphy, Konrad Hochedlinger, Darrell N Kotton, and Gustavo Mostoslavsky. 2009. “Induced Pluripotent Stem Cell Generation Using a Single Lentiviral Stem Cell Cassette.” *Stem Cells* 27 (3): 543–49. doi:10.1634/stemcells.2008-1075\rstemcells.2008-1075 [pii].
- Stadtfeld, M., and K. Hochedlinger. 2010. “Induced Pluripotency: History, Mechanisms, and Applications.” *Genes & Development* 24 (20): 2239–63. doi:10.1101/gad.1963910.*
- Stadtfeld, Matthias, Nimet Maherali, David T Breault, and Konrad Hochedlinger. 2008. “Defining Molecular Cornerstones during Fibroblast to iPS Cell Reprogramming in Mouse.” doi:10.1016/j.stem.2008.02.001.
- Tada, Masako, Yousuke Takahama, Kuniya Abe, Norio Nakatsuji, and Takashi Tada. 2001. “Nuclear Reprogramming of Somatic Cells by in Vitro Hybridization with ES Cells.” *Current Biology* 11 (19): 1553–58. doi:10.1016/S0960-9822(01)00459-6.
- Tada, Sako, Takashi Tada, Louis Lefebvre, Sheila C. Barton, and M. Azim Surani. 1997. “Embryonic Germ Cells Induce Epigenetic Reprogramming of Somatic Nucleus in Hybrid Cells.” *EMBO Journal* 16 (21): 6510–20. doi:10.1093/emboj/16.21.6510.
- Takahashi, Kazutoshi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, and Shinya Yamanaka. 2007. “Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors.” *Cell* 131 (5): 861–72. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.
- Takahashi, Kazutoshi, and Shinya Yamanaka. 2006. “Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors.” *Cell* 126 (4): 663–76. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024.
- Varas, Florencio, Matthias Stadtfeld, Luisa de Andres-Aguayo, Nimet Maherali, Alessandro di Tullio, Lorena Pantano, Cedric Notredame, Konrad Hochedlinger, and Thomas Graf. 2009. “Fibroblast-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Show No Common Retroviral Vector Insertions.” *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 27 (2): 300–306. doi:10.1634/stemcells.2008-0696.
- Wang, Quan, Xinxiu Xu, Jun Li, Jing Liu, Haifeng Gu, Ru Zhang, Jiekai Chen, et al. 2011. “Lithium, an Anti-Psychotic Drug, Greatly Enhances the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells.” *Cell Research* 21 (10). Nature Publishing Group: 1424–35. doi:10.1038/cr.2011.108.
- Wang, Yixuan, Chen-Guang Zheng, Yonghua Jiang, Jiqin Zhang, Jiayu Chen, Chao Yao, Qingguo Zhao, et al. 2012. “Genetic Correction of β -Thalassemia Patient-Specific iPS Cells and Its Use in Improving Hemoglobin Production in Irradiated SCID Mice.” *Cell Research* 22 (4). Nature Publishing Group: 637–48. doi:10.1038/cr.2012.23.
- Warren, Luigi, Philip D Manos, Tim Ahfeldt, Yui-Han Loh, Hu Li, Frank Lau, Wataru Ebina, et al. 2016. “Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA.” *Cell Stem Cell* 7 (5). Elsevier: 618–30. doi:10.1016/j.stem.2010.08.012.
- Wernig, M, A Meissner, R Foreman, T Brambrink, M Ku, K Hochedlinger, B E Bernstein, and R Jaenisch. 2007. “In Vitro Reprogramming of Fibroblasts into a Pluripotent ES-Cell-like State.” *Nature* 448 (7151): 318–24. doi:nature05944 [pii]\r10.1038/nature05944.

- Wilmut, I, A E Schnieke, J McWhir, A J Kind, and K H S Campbell. 1997. "Viable Offspring Derived from Fetal and Adult Mammalian Cells." *Nature* 385 (6619): 810–13. <http://dx.doi.org/10.1038/385810a0>.
- Wilson, Matthew H, Craig J Coates, and Alfred L George Jr. 2007. "PiggyBac Transposon-Mediated Gene Transfer in Human Cells." *Molecular Therapy* 15 (1): 139–45. doi:10.1038/sj.mt.6300028.
- Woltjen, Knut, Iacovos P Michael, Paria Mohseni, and Ridham Desai. 2013. "Europe PMC Funders Group piggyBac Transposition Reprograms Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells" 458 (7239): 766–70. doi:10.1038/nature07863.piggyBac.
- Yamanaka, Shinya, and Helen M. Blau. 2010. "Nuclear Reprogramming to a Pluripotent State by Three Approaches" 18 (9): 1199–1216. doi:10.1016/j.micinf.2011.07.011.Innate.*
- Yang, Jian, and Ming Hong Shen. 2006. "Nuclear Reprogramming: Methods and Protocols." In , edited by Steve Pells, 59–66. Totowa, NJ: Humana Press. doi:10.1385/1-59745-005-7:59.*
- Yang, Xiangzhong, Sadie L Smith, X Cindy Tian, Harris a Lewin, Jean-Paul Renard, and Teruhiko Wakayama. 2007. "Nuclear Reprogramming of Cloned Embryos and Its Implications for Therapeutic Cloning." *Nature Genetics* 39 (3): 295–302. doi:10.1038/ng1973.
- Yang, Yuanyuan, Xiaobai Zhang, Li Yi, Zhenzhen Hou, Jiayu Chen, Xiaochen Kou, Yanhong Zhao, et al. 2016. "Naïve Induced Pluripotent Stem Cells Generated From β -Thalassemia Fibroblasts Allow Efficient Gene Correction With CRISPR/Cas9." *Stem Cells Translational Medicine* 5 (2): 267. doi:10.5966/sctm.2015-0157erratum .
- Ye, Zhaohui, Cyndi F. Liu, Lucie Lanikova, Sarah N. Dowey, Chaoxia He, Xiaosong Huang, Robert A. Brodsky, Jerry L. Spivak, Josef T. Prchal, and Linzhao Cheng. 2014. "Differential Sensitivity to Jak Inhibitory Drugs by Isogenic Human Erythroblasts and Hematopoietic Progenitors Generated from Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells." *Stem Cells* 32 (1): 269–78. doi:10.1002/stem.1545.
- Yu, J Y, M a Vodyanik, K Smuga-Otto, J Antosiewicz-Bourget, J L Frane, S Tian, J Nie, et al. 2007. "Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells." *Science* 318 (5858): 1917–20. doi:10.1126/science.1151526.
- Yu, Junying, and James A Thomson. 2006. "Human Embryonic Stem Cells Reprogram Myeloid Precursors Following Cell–Cell Fusion." *Stem Cells* 24: 168–76. doi:10.1634/stemcells.2005-0292.
- Yusa, Kosuke, Roland Rad, Junji Takeda, and Allan Bradley. 2009. "Generation of Transgene-Free Induced Pluripotent Mouse Stem Cells by the piggyBac Transposon." *Nature Methods* 6 (5): 363–69. doi:10.1038/nmeth.1323.
- Zhou, Hongyan, Shili Wu, Jin Young Joo, Saiyong Zhu, Dong Wook Han, Tongxiang Lin, Sunia Trauger, et al. 2009. "Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins." *Cell Stem Cell* 4 (5): 381–84. doi:10.1016/j.stem.2009.04.005.
- Zhou, Wenbo, and Curt R. Freed. 2009. "Adenoviral Gene Delivery Can Reprogram Human Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells." *Stem Cells* 27 (11): 2667–74. doi:10.1002/stem.201.
- Zou, Jizhong, Prashant Mali, Xiaosong Huang, Sarah N Dowey, and Linzhao Cheng. 2011. "Site-Specific Gene Correction of a Point Mutation in Human iPS Cells Derived from an Adult Patient with Sickle Cell Disease." *Blood* 118 (17): 4599–4608.
- Zou, Jizhong, Colin L Sweeney, Bin-kuan Chou, Uimook Choi, Jason Pan, Hongmei Wang, Sarah N Dowey, Linzhao Cheng, and Harry L Malech. 2011. "Plenary Paper Oxidase-Deficient Neutrophils from X-Linked Chronic Granulomatous Disease iPS Cells : Functional Correction by Zinc Finger Nuclease – Mediated Safe Harbor Targeting." *Blood* 117 (21): 5561–72. doi:10.1182/blood-2010-12-328161.